

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06475

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 9/64, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02,  
C12P21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027,  
G01N 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 9/64, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02,  
C12P21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027,  
G01N 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LITTLE, S.P. et al. "Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain", The Journal of Biological Chemistry (1997) Vol. 272, No. 40 p. 25135-25142	1-40
Y	YAMAMURA, Y. et al. "Molecular cloning of a novel brain-specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications (1997) Vol. 239, No. 2 p. 386-392	1-40
A	DANIEL, A. et al. "Excessive urokinase-type plasminogen activator activity in the euglobulin fraction of patients with Alzheimer-type dementia", Journal of the Neurological Sciences (1996) Vol. 139, No. 1 p. 83-88	1-40
A	HINDS, T.R. et al., "Relationship between serum $\alpha$ 1-antichymotrypsin and Alzheimer's disease", Neurobiology of Aging (1994), Vol. 15, No. 1 p. 21-27	1-40

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 February, 2000 (15.02.00)

Date of mailing of the international search report  
22 February, 2000 (22.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

12



European Patent  
Office

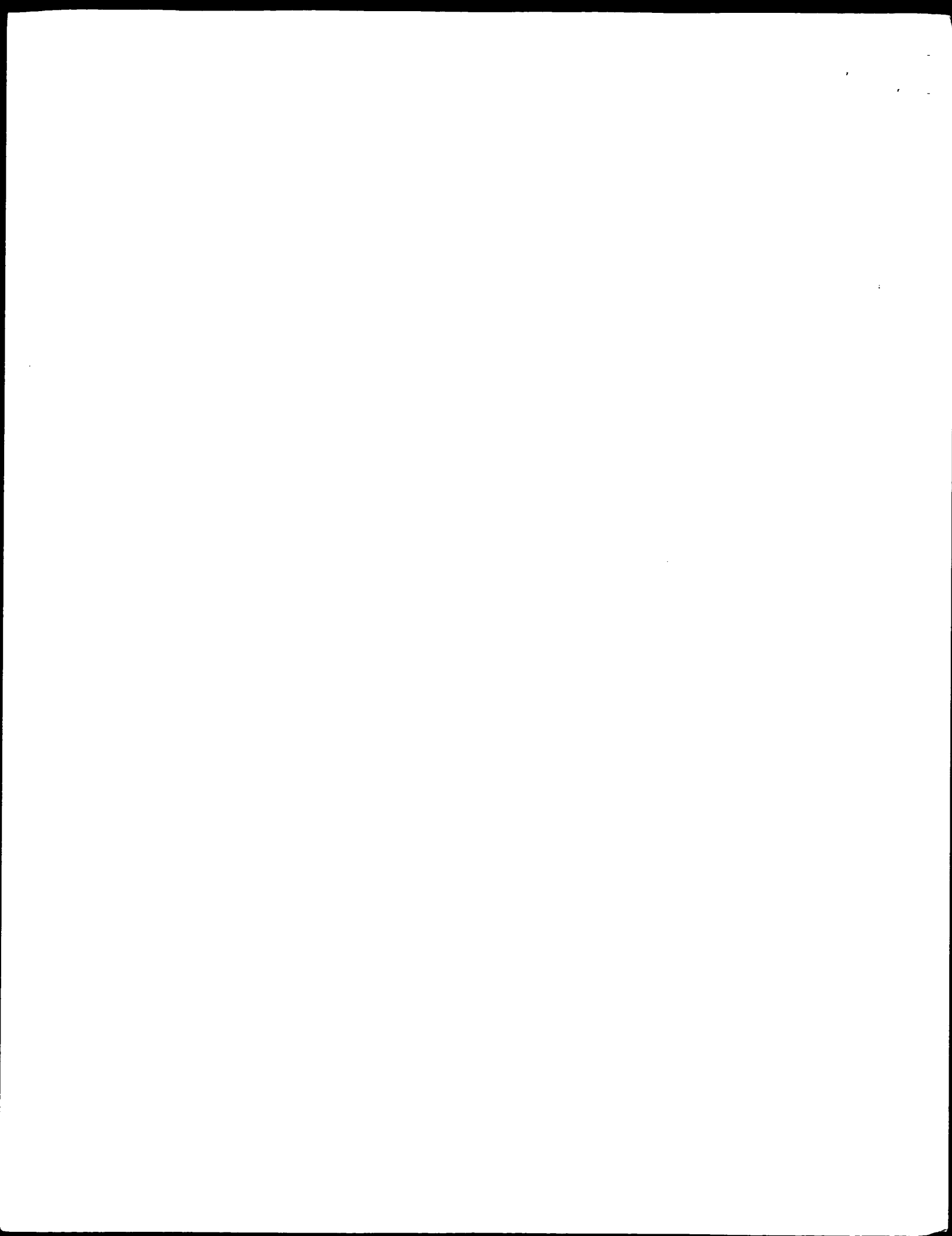
**SUPPLEMENTARY  
PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number

which under Rule 45 of the European Patent Convention EP 99 97 2686 shall be considered, for the purposes of subsequent proceedings, as the European search report

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.CI.7)
AD X	DATABASE EMBL 'Online! Accession Number U75329, 13 October 1997 (1997-10-13) XP002187635 * the whole document *	1-18, 21-23	C12N15/52 C12N9/64 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C07K16/40 A01K67/027 G01N33/53
AB X	YAMASHIRO K ET AL: "Molecular cloning of a novel trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL XP002075096 ISSN: 0167-4781 * abstract * * page 386, column 2, paragraphs 3,4 *	1-18, 21-23	
AC P,X	DATABASE EMBL 'Online! Accession Number AF123453, 7 June 1999 (1999-06-07) XP002187636 * the whole document *	1-18, 21-23	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.CI.7)
			C12N C12P C12Q C07K A01K G01N
The supplementary search has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
<b>INCOMPLETE SEARCH</b>			
The Search Division considers that the present application, or some or all of its claims, does/do not comply with the EPC to such an extent that a meaningful search into the state of the art cannot be carried out, or can only be carried out partially, for the following claims: Claims searched completely :  Claims searched incompletely :  Claims not searched :  Reason for the limitation of the search: see sheet C			
Place of search <b>MUNICH</b>		Date of completion of the search <b>18 January 2002</b>	Examiner <b>Chavanne, F</b>
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

3  
EPO FORM 1503 03.92 (P04C20)







European Patent  
Office

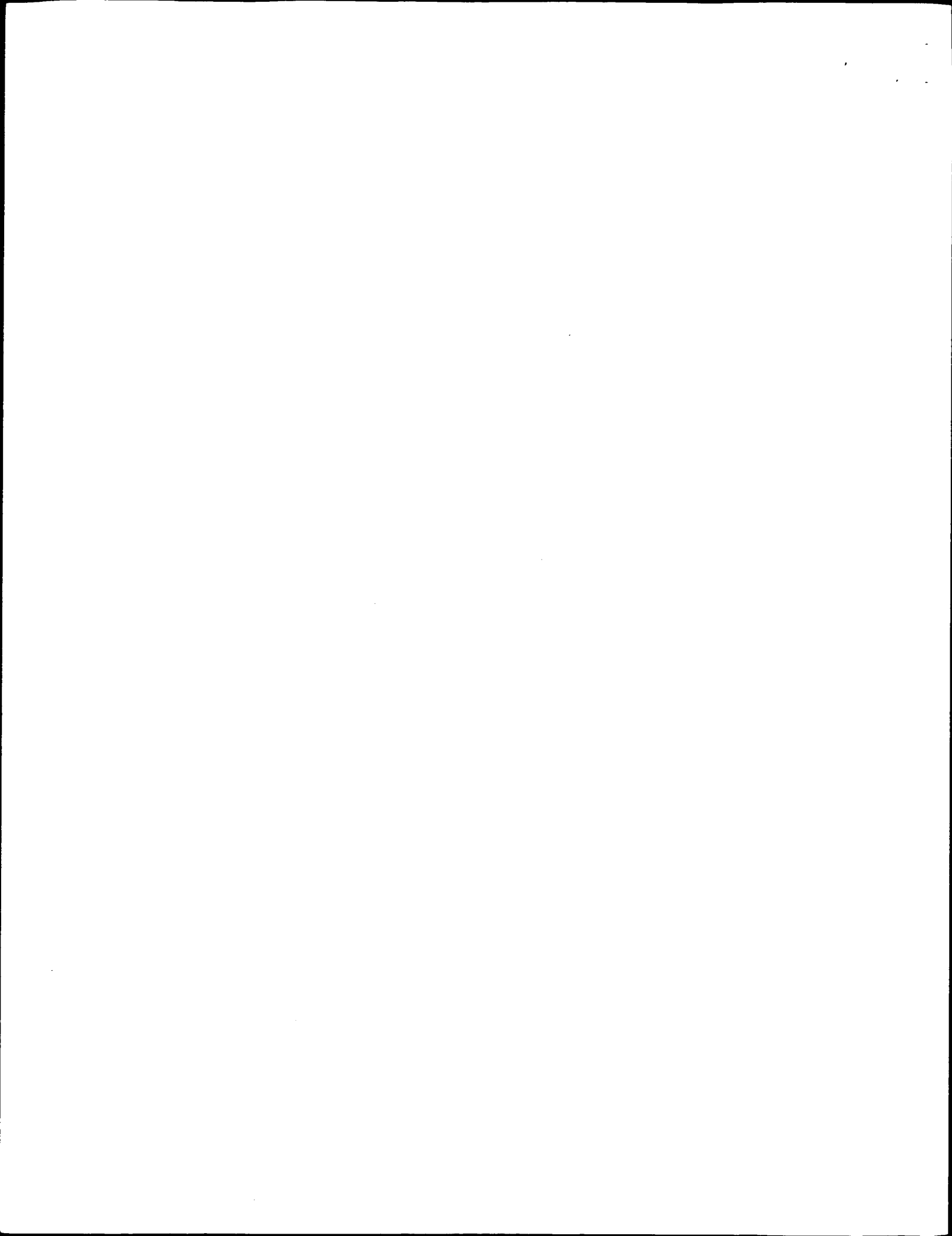
# PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number  
EP 99 97 2686

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.CI.7)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
AA P,X	EP 0 949 334 A (SUNTORY LTD) 13 October 1999 (1999-10-13) * column 1, line 22 - line 51 * * example 1 * -----	1-18, 21-23	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.CI.7)

3

EPO FORM 1503 03.82 (P4/C10)



EP 99 97 2686

18-01-2002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0949334 A	13-10-1999	JP 11032778 A	09-02-1999
		EP 0949334 A1	13-10-1999
		WO 9905290 A1	04-02-1999



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 29 June 2000 (29.06.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/06475	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 661638
<b>International filing date</b> (day/month/year) 19 November 1999 (19.11.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 20 November 1998 (20.11.98)
<b>Applicant</b> UEMURA, Hidetoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 June 2000 (07.06.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b>  Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--



特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 661638	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06475	国際出願日 (日.月.年) 19.11.99	優先日 (日.月.年) 20.11.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 9/64, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02, C12P 21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, C07K 16/40, A01K 67/027, G01N 33/53		
出願人(氏名又は名称)  扶桑薬品工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 07.06.00	国際予備審査報告を作成した日 02.02.01		
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  六笠 紀子 印	4B	9735
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

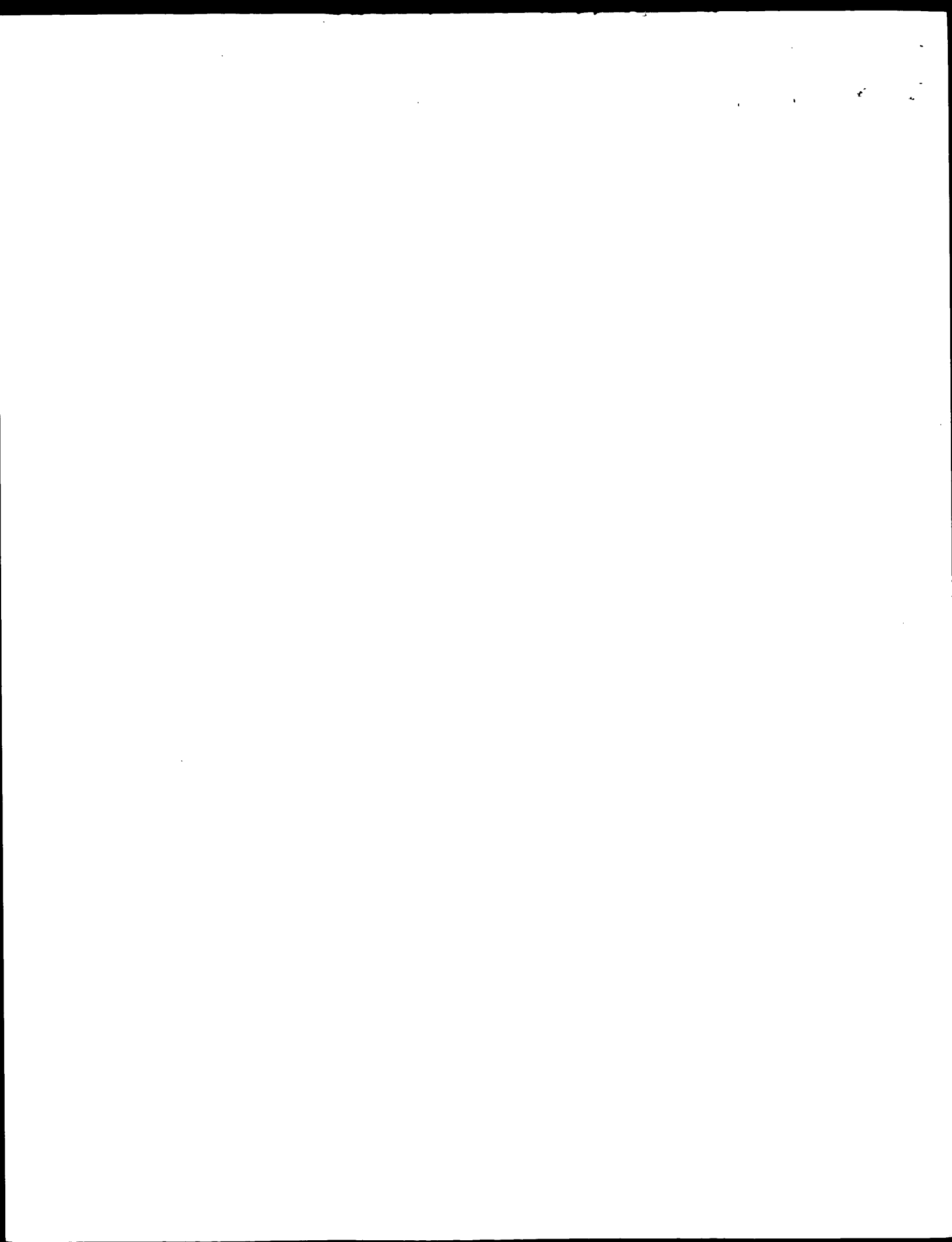
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-40

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-40

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-40

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

引用文献1: LITTLE, S. P. et al. "Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain",  
The Journal of Biological Chemistry (1997) Vol. 272, No. 40 p. 25135-25142

引用文献2: YAMAMURA, Y. et al. "Molecular cloning of a novel brain-specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs",  
Biochemical and Biophysical Research Communications (1997)  
Vol. 239, No. 2 p. 386-392

## 請求の範囲 1-40について

引用文献1には、アルツハイマー患者の脳から、新規セリンプロテアーゼを単離し、アミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を決定したことが記載されている。

引用文献2には、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRにより新規プロテアーゼのcDNA及びアミノ酸配列を決定することが記載されている。

ここで、引用文献2に記載された方法を用いて、引用文献1に記載されたように脳から新規セリンプロテアーゼを単離することは当業者が容易に想到し得たものと認める。

また、このようにして得られたプロテアーゼをコードする遺伝子を適当なベクターに組み込んで細胞を形質転換してプロテアーゼを発現させること、プロテアーゼに対する抗体を調製して、該プロテアーゼを検出すること、遺伝子を疾患のマーカーとして用いること、トランスジェニック非ヒト動物を作製することは当業者が容易に想到し得たものと認める。

従って、請求の範囲1乃至40に係る発明は引用文献1及び2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。



117 091856371 /  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 661638	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/06475	International filing date (day/month/year) 19 November 1999 (19.11.99)	Priority date (day/month/year) 20 November 1998 (20.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/52, 9/64, 1/21, 5/10, C12P 21/02, 21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027, G01N 33/53		
Applicant FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 07 June 2000 (07.06.00)	Date of completion of this report 02 February 2001 (02.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06475

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



2

7



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06475

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-40	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-40	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-40	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: Little, S. P. et al., "Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain," The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, No. 40, 1997, p. 25135-25142

Document 2: Yamamura, Y. et al., "Molecular cloning of a novel brain-specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs," Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 239, No. 2, 1997, p. 3386-392

#### Claims 1-40

Document 1 describes the isolation of a novel serine protease from the brains of Alzheimer's disease patients, and the determination of its amino acid sequence and the base sequence that codes for it.

Document 2 describes the determination of the cDNA and amino acid sequence of a novel protease obtained by PCR using an oligonucleotide primer for the serine protease consensus sequence.

Persons skilled in the art can easily conceive of isolating novel serine proteases from brains such as those described in document 1 using the method described in document 2.

Moreover, persons skilled in the art can easily conceive of inserting the gene that codes for a protease thus obtained into a suitable vector and transforming cells such that they express that protease, preparing antibodies against those proteases, detecting those proteases, using genes as markers in patients, and preparing transgenic non-human animals.

Therefore, persons skilled in the art can easily prepare the inventions set forth in Claims 1-40 based on the descriptions in documents 1 and 2.



EP

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 661638	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06475	国際出願日 (日.月.年) 19.11.99	優先日 (日.月.年) 20.11.98
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

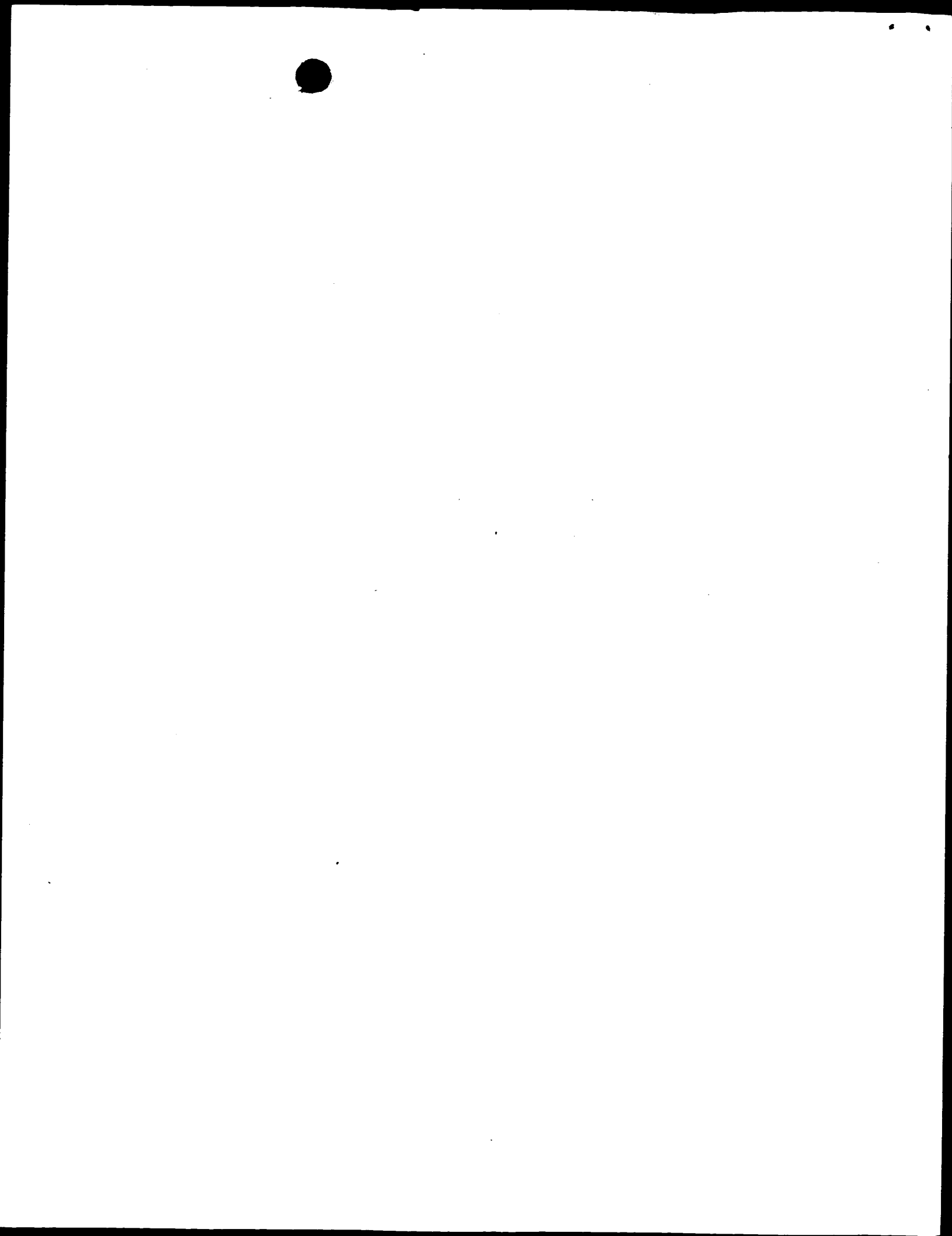
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

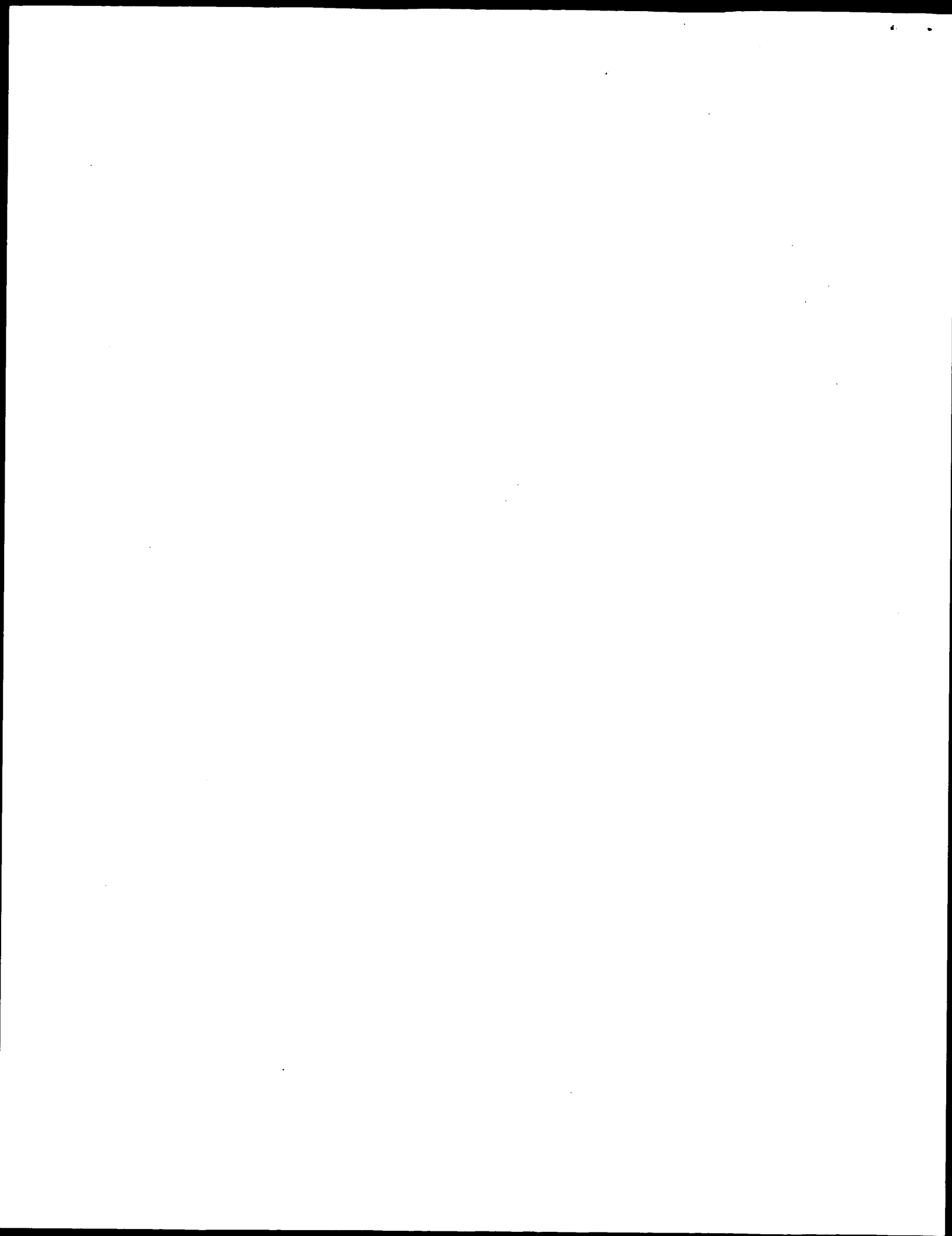
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 9/64, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02, C12P 21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027, G01N 33/53		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 9/64, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02, C12P 21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027, G01N 33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LITTLE, S.P. et al. "Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain", The Journal of Biological Chemistry (1997) Vol. 272, No. 40 p. 25135-25142	1-40
Y	YAMAMURA, Y. et al. "Molecular cloning of a novel brain-specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications (1997) Vol. 239, No. 2 p. 386-392	1-40
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15.02.00	国際調査報告の発送日 22.02.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9735 印



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	DANIEL, A. et al. "Excessive urokinase-type plasminogen activator activity in the euglobulin fraction of patients with Alzheimer-type dementia", Journal of the Neurological Sciences (1996) Vol. 139 , No. 1 p. 83-88	1 - 4 0
A	HINDS, T. R. et al. "Relationship between serum $\alpha$ 1-antichymotrypsin and Alzheimer's disease", Neurobiology of Aging (1994) Vol. 15 , No. 1 p. 21-27	1 - 4 0





PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協定条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類7</b> C12N 15/52, 9/64, 1/21, 5/10, C12P 21/02, 21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027, G01N 33/53	A1	<b>(11) 国際公開番号</b> WO00/31272  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年6月2日(02.06.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/06475  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年11月19日(19.11.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/347785 1998年11月20日(20.11.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 植村英俊(UEMURA, Hidetoshi)(JP/JP) 〒664-0883 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133 Hyogo, (JP) 奥井 文(OKUI, Akira)(JP/JP) 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ睦603号 Nara, (JP) 小南勝也(KOMINAMI, Katsuya)(JP/JP) 〒599-0212 大阪府阪南市自然田786-2 Osaka, (JP) 山口 希(YAMAGUCHI, Nozomi)(JP/JP) 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御霊口町285-79 Kyoto, (JP)	<b>(21) 三井真一(MITSUI, Shinichi)(JP/JP)</b> 〒606-8267 京都府京都市左京区北白川西町86 北白川コーポラス202号 Kyoto, (JP) <b>(74) 代理人</b> 青山 蔭, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54)Title: NOVEL SERINE PROTEASE BSSP2</b>  <b>(54)発明の名称 新規セリンプロテアーゼBSSP2</b>  <b>(57) Abstract</b> Proteins having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8 and 10; proteins having amino acid sequences derived from these amino acid sequences by deletion, substitution or addition of one to several amino acids; and base sequences encoding the same. Transgenic non-human animals with altered expression level of a serine protease BSSP2; an antibody against BSSP2; and a method for detecting BSSP2 in a specimen by using the antibody.		

(57)要約

配列番号2、4、6、8および10に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、これらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸からなるタンパク質、これらをコードする塩基配列を提供する。さらに、BSSP2の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、BSSP2に対する抗体、該抗体を用いる検体中のBSSP2の検出方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	CM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	CN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	CW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン				
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KR	韓国	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 新規セリンプロテアーゼ B S S P 2

## 5 発明の分野

本発明は単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ（本明細書において各々「h B S S P 2」および「m B S S P 2」と称し、両者を区別しない場合は単に「B S S P 2」とする。）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体および多形性変種ならびにそれらの検出方法に関する。さらには、h B S S P 2およびm B S S P 2タンパク質ならびにh B S S P 2およびm B S S P 2ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含む組成物、それらの製造方法および使用に関する。

## 発明の背景

15 プロテアーゼは、一般に不活性前駆体として生合成され、分子内で限定加水分解を受け活性型プロテアーゼへ変換される。プロテアーゼである限りペプチド結合を加水分解する作用を有するが、種類によってその作用様式は極めて異なる。プロテアーゼはその触媒基の種類により、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。

20 各種のプロテアーゼは消化性を有するものから、様々な調節ドメインを持ち基質特異性が厳密で固有のタンパク質のみを特異的に加水分解するものまで、それらの性質は多彩である。

翻訳後のタンパク質に対しても様々なプロセッシングが行われ、活性型タンパク質が作られる。多くの分泌タンパク質は、まず、活性型タンパク質のN末端に通常15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に関与するペプチド（分泌シグナル）を付けた不活性前駆体型（プロ体）として細胞質内のリボソーム上で合成される。このペプチド部分は細胞膜を通過する機構に関連しており、ほとんどの場合、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断・除去され、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルは中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域

を持ち、N末端近くには塩基性アミノ酸残基を有している。分泌シグナルはシグナルペプチドと同義語である。また、ある種のタンパク質は不活性前駆体のN末端にさらに分泌シグナルが結合しているものも存在し、このようなタンパク質をプレプロタンパク質（プレプロ体）という。

- 5       例えば、トリプシンはアミノ酸に翻訳された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼもしくはトリプシン自体により限定加水分解されて活性型トリプシンとなる。

- 10       セリンプロテアーゼの至適pHは、中性から弱アルカリ性で、分子量は一般に30,000以下の場合が多い。分子量の大きい血液凝固・線溶・補体系プロテアーゼは、すべてトリプシン様セリンプロテアーゼに属しており、これらは多くの調節ドメインを持ち、生体反応において極めて重要なプロテアーゼカスケードを形成している。

- 15       最近、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRにより多くの新規プロテアーゼのcDNAおよびアミノ酸配列が決定されている。この方法により、Yamamuraら（Yamamura, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 386, 1997）、Gschwendら（Gschwend, T. P. et al. ; Mol. Cell. Neurosci., 9, 207, 1997）、Chenら（Chen, Z-L. et al. ; J. Neurosci., 15, 5088, 1995）およびその他の多数の研究者が新規セリンプロテアーゼを発見している。

- 20       特開平9-149790号の配列番号3には新規セリンプロテアーゼニューロシン（Neurosin）が開示されており、またニューロシンは Biochimica et Biophysica Acta, 1350, 11-14, 1997にも報告されている。これによりセリンプロテアーゼ遺伝子を用いてニューロシンを大量に生産する方法および該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法が提供される。また、当該スクリー  
25       ング方法は、各種疾患治療剤の探索に有用であることも示されている。

ニューロシンのように脳・神経系で発現されるセリンプロテアーゼは脳・神経系において種々の役割を果たしていると考えられる。従って、脳・神経系において発現されている新規プロテアーゼをコードする遺伝子の単離およびこの遺伝子を使用したタンパク質の生産は、脳・神経系に関連する各種疾患の診断および治

療に有用である可能性がある。

ADの臨床診断は今日、DSM-IIIRおよびNINCDS-ADRDAの診断基準 (McKhann, G. et al. ; Neurology, 34, 939, 1994) または、DSM-IVの診断基準 (American Psychiatric Association ; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4th ed, Washington DC, American Psychiatric Association, 1994) に基づいて一般的に行われている。しかし、これらの診断基準は、日常生活や社会生活上重大な支障を引き起こすほどの認知機能の低下を条件としているため、患者一人一人の社会生活のレベル、さらに診断に当たる医師の専門性、経験にも左右され得るものであり、科学的客観性に乏しいことが指摘されている。

また、アルツハイマー病の確定診断は、病理組織学的検索によりなされるわけであるが、臨床診断と剖検診断との不一致も少なからず指摘されている。

現在、アルツハイマー病の臨床診断では補助的手段として画像診断も用いられるようになり、PETやSPECTにより海馬、大脳皮質の頭頂葉等の特異的な部位においてアルツハイマー病に特異的な代謝の低下、萎縮を初めとする脳機能の検査が可能となった。しかしながら、頭頂葉から側頭葉にかけての血流低下によりアルツハイマー病を確定するのは極めて危険である。また、MRS検査では、アルツハイマー病を含む痴呆患者に関して有用である報告は殆どない。さらに、CT・MRI画像診断も用いられているが、脳の萎縮やPVL等の白質病巣はアルツハイマー型痴呆に特異的ではなく、脳萎縮は年齢と共に進行することが報告されており、必ずしもアルツハイマー型痴呆に対して前記所見が見られるとは限らない。また、MRIは磁場強度や装置の性能または撮影条件により得られる画質が異なるため、異なる施設間で数値的比較ができるのは萎縮性変化のみである。また、血管性痴呆でも脳室拡大を認め得るし、脳底動脈領域の虚血後に海馬の萎縮を認める症例も存在する。

生物学的診断マーカーの開発は、この様な経緯の中からADの臨床診断に、より正確的な客観性を与えるものとして多くの研究者から求められてきたと同時に、1) AD治療薬の客観的な効果判定システム、2) ADの診断基準を満たす以前の、あるいは発症前のADの検出という将来的に重要な役割が期待されている。さらに、同一の診断マーカーを用いることにより、異なる施設間の比較研究も可

能となる。したがって、生物学的診断マーカーの開発は、多くのAD研究領域の中でも、最も重要な領域として認識され、将来への展望が期待されている。現在までに行われてきた診断マーカー開発へのアプローチは、ADを特徴付ける病理学的変化である老人斑や神経原線維変化の構成成分からのアプローチと、それ以外

5 外の物からのアプローチに大別される。前者として脳脊髄液タウタンパク質、A $\beta$ およびその前駆体タンパク質である $\beta$ APP、後者として抗コリン剤による瞳孔散大試験、Apo Eおよび他のAD関連遺伝子があるが良好な結果は得られていない。

セリンプロテアーゼは、癌細胞においても重要な役割を担っていると考えられる。癌を外科的にあるいは局所的放射線照射で根絶することが困難である理由は、癌に転移能力があるからである。固形腫瘍細胞が体内に広がるには、本来隣接していた細胞との接着をゆるめて、本来の組織から離れ、他の組織の中を通り血管もしくはリンパ管に到達し、基底層と管の内皮層を抜けて循環系に入り、体のどこかで循環系から出て、新しい環境中で生存し、増殖しなければならない。各種

10 癌腫での隣接する上皮細胞との接着性は、上皮の細胞間接着分子であるカドヘリンが発現されなくなると失われるが、組織の突破は細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素に依存すると考えられている。

マトリックスを分解する酵素として主に金属プロテアーゼ (Rha, S. Y. et al. ; Breast Cancer Research Treatment, 43, 175, 1997) とセリンプロテアーゼがある。これらは共同してコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのようなマトリックスタンパク質を分解する。特に今まで知られているセリンプロテアーゼの中でマトリックスの分解に関与するものとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (U-P A) がある。U-P Aはタンパク分解連鎖反応に特異的な引き金の役割を持つ。その直接の標的はプラスミノゲンで、これは

20 血中に豊富に存在し、傷や腫瘍および炎症部位などの組織の再構築部位に蓄積する不活性なセリンプロテアーゼの前駆体である。その他に、癌の転移・浸潤に関与しているプロテアーゼとして組織因子、ライソゾーム系の加水分解酵素およびコラゲナーゼ等が知られている。

現在我が国の死因の第一位を占める癌で、年間20万人以上が死亡している。

ゆえに、癌の診断および治療もしくは予防の目印となる特異物質の研究が精力的に行われている。この特異物質を腫瘍マーカーもしくは腫瘍マーカー関連バイオマーカーと名付けている。これらは癌の治療前診断補助、発生臓器および病理組織型の推定、治療効果のモニタリング、再発の早期発見や予後の予測等にご利用され、現在では腫瘍マーカーを用いる検査は臨床に不可欠の検査となっており、中でも肝細胞癌やヨークサック腫瘍に特異性が高いアルファ胎児タンパク質（AFP）（Taketa, K. et al. ; Tumour Biol., 9, 110, 1988）および癌胎児性タンパク抗原（CEA）は世界中で広く利用されている。将来、腫瘍マーカーの必要性は益々高まり、信頼性の高い癌の血清学的診断法に有用な臓器特異的マーカー、腫瘍細胞種特異的マーカー等の開発が期待されている。現在までにヒト前立腺上皮細胞で発現しているセリンプロテアーゼであるヒト腺性カリクレイン（hK2）は前立腺癌のマーカーとして有用であることが報告されている。また、hK2は前立腺特異的抗原（PSA）の配列と78%の相同性を有しており、PSAも前立腺癌の生化学的マーカーとして広く使用されている（Mikolajczyk, S. D. et al. ; Prostate, 34, 44, 1998、Pannek, J. et al. ; Oncology, 11, 1273, 1997、Chu, T. M. et al. ; Tumour Biology, 18, 123, 1997、Hsieh, M. et al. ; Cancer Res., 57, 2651, 1997）。さらに、hK2は前立腺癌のマーカーだけでなく、胃癌のマーカーとしても有用であることが報告されている（Cho, J. Y. et al. ; Cancer, 79, 878, 1997）。その他、血清中サイトケラチン19フラグメントを測定するシフラ（CYFRA 21-1）は肺癌に対して有用な腫瘍マーカーであること（Sugiyama, Y. et al. ; Japan J. Cancer Res., 85, 1178, 1994）、ガストリン放出ペプチド前駆体（ProGRP）が肺小細胞癌に対して有用な腫瘍マーカーであること（Yamaguchi, K. et al. ; Japan, J. Cancer Res., 86, 698, 1995）が報告されている。

25

#### 発明の目的

ゆえに、本発明の主な目的は、脳、肺、前立腺、精巣、骨格筋および肝臓等の各種組織において、アルツハイマー病（AD）、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性がある

り、さらに、現在用いられている診断マーカーに取って代わる、優れたマーカーとなり得る新規セリンプロテアーゼを提供することである。

### 発明の概要

5       この様な状況の中、我々はヒトおよびマウス新規セリンプロテアーゼをコードする cDNA のクローニングに成功した。

      本発明を概説すれば、本発明の第 1 の態様は生物学的に活性な、成熟体セリンプロテアーゼ B S S P 2 のアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。

10       すなわち、配列番号 2 に示すアミノ酸 238 個から成るアミノ酸配列（成熟型 B S S P 2（配列番号 2））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 1、塩基番号 1～714）である。また、実質的に配列番号 2 に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。

15       さらに、これらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。あるアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、各アミノ酸配列を有するタンパク質が同等の性質を有する範囲内で該アミノ酸配列に 1 もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入等の修飾を施したアミノ酸配列をいう。タンパク質の修飾体には、例えば、リン酸付加体、糖鎖付加体、金属付加体（カルシウム付加体など）、他のタンパク質、例えばアルブミン等との融合体、または  
20       タンパク質の二量体等が含まれる。

      なお、以下に示す配列表中の塩基配列中における「n」記号は、通常の核酸塩基、アデニン（a）、シトシン（c）、グアニン（g）、チミン（t）のいずれかがその位置があることを意味する。

25       本発明の第 2 の態様は、成熟体 B S S P 2 アミノ酸配列（配列番号 2）の N 末端側に、配列番号 4 に示す－35 から－1 までの 35 個のアミノ酸が付加された、アミノ酸 273 個から成るアミノ酸配列（タイプ 1 B S S P 2（配列番号 4））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号 3、塩基番号 247～1065）である。また、実質的に配列番号 4 に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらに、これらのアミノ酸



配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

5 本発明の第3の態様は、成熟体BSSP2アミノ酸配列（配列番号2）のN末端側に、配列番号6に示す-73から-1までの73個のアミノ酸が付加された、アミノ酸311個から成るアミノ酸配列（タイプ2BSSP2（配列番号6））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号5、塩基番号516～1448）である。また、実質的に配列番号6に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらに、これらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

10 本発明の第4の態様は、成熟体BSSP2アミノ酸配列（配列番号2）のN末端側に、配列番号8に示す-207から-1までの207個のアミノ酸が付加された、アミノ酸445個から成るアミノ酸配列（タイプ3BSSP2（配列番号8））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号7、塩基番号116～1450）である。また、実質的に配列番号8に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらに、これらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

15 本発明の第5の態様は、生物学的に活性な、成熟体ヒトのセリンプロテアーゼ、hBSSP2のアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。すなわち、配列番号10（アミノ酸番号1～240）に示すアミノ酸240個から成るアミノ酸配列（成熟型hBSSP2（配列番号10））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号9、塩基番号807～1526）である。また、実質的に配列番号10（アミノ酸番号1～240）に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。さらに、これらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

25 本発明の第6の態様は、成熟体ヒトのセリンプロテアーゼ、hBSSP2のアミノ酸配列（配列番号10、アミノ酸番号1～240）のN末端に、配列番号10に示す-217～-1までの217個のアミノ酸が付加されたアミノ酸457個から成るアミノ酸配列（配列番号10、アミノ酸番号-217～240）および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号9、塩基番号156～1526）である。また、実質的に配列番号10に類似するアミノ酸配列および実質的に

に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。さらに、これらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

5 本発明の第7の態様は、配列番号10のアミノ酸-217~-1に示すアミノ酸217個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号9、塩基番号156~806）である。また、実質的に配列番号10のアミノ酸-217~-1に示すアミノ酸217個から成るアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。さらに、これらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

10 また、本発明は、配列番号1、3、5、7および9に示す塩基配列、ならびにこれらに類似する塩基配列にも関する。

本発明の第8の態様は、第1~第7の態様の塩基配列を含むベクター、これにより形質転換された形質転換細胞である。

本発明の第9の態様は、第6の態様の形質転換細胞からBSSP2タンパク質を製造する方法である。

15 本発明の第10の態様は、BSSP2遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物である。

本発明の第11の態様は、BSSP2タンパク質またはその断片に対する抗体およびその製造方法である。

20 本発明の第12の態様は、第9の態様の抗体を用いる検体中のBSSP2タンパク質またはその断片を測定する方法である。

本発明の第13の態様は、BSSP2タンパク質を含む疾患の診断マーカーである。

25 以下、本明細書において、特記しない限り、各配列番号が示す塩基配列には、上記に示した種々のその断片、類似する塩基配列またはこれらの断片を含み、各配列番号が示すアミノ酸配列には、上記に示した種々のその断片、類似するアミノ酸配列、またはこれらの断片、もしくはこれらの修飾体を含むものとする。また、本明細書において、特記しなき限り、BSSP2、hBSSP2、mBSSP2には、上記に示した各アミノ酸配列を有するタンパク質を含むものとする。

### 図面の簡単な説明

図1は、実施例2におけるマウスから調製したmRNAを用いたノザンブロットの結果を示す図である。

5 図2は、実施例2におけるマウスから調製したmRNAを用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図3は、実施例4の方法により構築したプラスミド図である。

図4は、実施例4の方法によるプラスミドpFBTrypSigTag/BSSP2の構築図である。

10 図5は、ノザンハイブリダイゼーションによるhBSSP2 mRNAの検出を示す図である。

図6は、RT-PCRによるhBSSP2 mRNAの検出を示す図である。

図7は、バキュロウイルス系によるhBSSP2の発現を示す図である。

### 発明の詳細な説明

15 本発明のhBSSP2もしくはmBSSP2をコードする塩基配列は、該タンパク質を発現している細胞からmRNAを調製して、常法により二本鎖DNAに変換して得ることができる。mRNAの調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法(Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979)等を用いることができる。全RNAからのポリ(A)+RNAの調製はオリゴ(d

20 T)を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られたRNAを鋳型にして、3'末端に存在するポリ(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマーあるいはhBSSP2もしくはmBSSP2のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、この様にして得られたmRNAに相補的なDNAもしくは

25 はcDNAから成るハイブリッドのmRNA鎖を、例えばイー・コリ(E. coli) RNase H、イー・コリ DNAポリメラーゼ1、イー・コリ DNAリガーゼで処理し、DNA鎖に変換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

hBSSP2もしくはmBSSP2遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、hBSSP2もしくはmBSSP2発現細胞ポリ(A)+RNAを鋳型にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、hBSSP2もしくはmBSSP2遺伝子塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法 (Mattenczi, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981) 等の核酸化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

上記のようにして得られたhBSSP2またはmBSSP2遺伝子を用いて、各種組織におけるこれらの発現を調べることができる。

ノザン・ブロット解析の場合、mBSSP2は、15-20日目のマウス胎児の頭、生後3ヶ月のマウスの肺、前立腺および精巣で発現を示し、hBSSP2は、脳、骨格筋および肝臓で発現を示した(図1、図2および図5参照)。RT-PCR解析の場合においては、mBSSP2は、生後12日の脳および精巣で、hBSSP2は、脳および骨格筋で発現が認められた。ゆえに、脳、前立腺、肺、精巣、骨格筋および肝臓において、本発明の新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。例えば、脳においてはアルツハイマー病(AD)、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。また、本発明のBSSP2およびそれをコードする遺伝子は、その他の組織においては癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。その他に血液凝固・線溶・補体系にも何らかの影響を及ぼしていると予想できる。さらに、セリンプロテアーゼの阻害剤は、アルツハイマー病、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および予防に用いることができる可能性がある。

新規マウスセリンプロテアーゼは、タイプ1、2および3に分類することができ、タイプ1はアミノ酸273個から成り、タイプ2はアミノ酸311個から成り、タイプ3はアミノ酸445個から成ることが証明された。これらのアミノ酸

5 配列中には成熟体セリンプロテアーゼとしてN末端側が Ile-Val-Gly-Gly-Gln-Ala-Valから始まる238個のアミノ酸配列を共通して含有していた。また、成熟型のセリンプロテアーゼのアミノ酸配列中には、セリンプロテアーゼの活性を有するコンセンサス配列が含有されており、また、糖鎖結合部位に特有のアミノ酸配列が2カ所以上存在していることから、該アミノ酸配列から少なくとも糖鎖は2カ所以上存在しているものと予想される。

また、新規ヒトセリンプロテアーゼ(hBSSP2)は、配列番号10に示す通り、hBSSP2成熟体のN末端側に、膜貫通領域およびスカベンジャーレセプターシステインリッチ様ドメインが存在していた。

10 本明細書中で言うプロ部分とはプロ体から活性型タンパク質を削除した部分を言い、プレ部分とはプレプロ体からプロ体を削除した部分を言い、プレプロ部分とはプレプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言う。

15 配列番号2に示すアミノ酸配列はアミノ酸238個から成るBSSP2成熟型あるいは活性型タンパク質であり、これをコードする配列番号1に示す塩基配列は塩基数714個から成る。本発明者らは本発明の成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数个程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、配列番号2に示すものが好ましい。

20 配列番号4に示すアミノ酸配列はアミノ酸273個から成るタイプ1BSSP2タンパク質であり、それをコードする配列番号3に示す塩基配列は塩基数1685個から成る。アミノ酸番号-35～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、配列番号4に示すアミノ酸配列は、BSSP2タンパク質の前駆体型と考えられる。

25 配列番号6に示すアミノ酸配列はアミノ酸311個から成るタイプ2BSSP2タンパク質であり、それをコードする配列番号5に示す塩基配列は塩基数2068個から成る。アミノ酸番号-73～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、配列番号6に示すアミノ酸配列は、BSSP2タンパク質の前駆体型と考えられる。

配列番号8に示すアミノ酸配列はアミノ酸445個から成るタイプ3BSSP

2タンパク質であり、それをコードする配列番号7に示す塩基配列は塩基数2070個から成る。アミノ酸番号-207~-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、配列番号8に示すアミノ酸配列は、BSSP2タンパク質の前駆体型と考えられる。

- 5 配列番号4、6および8中には共通なアミノ酸配列として配列番号2に示した成熟型BSSP2タンパク質を含有しており、さらに、配列番号4、6および8のそれぞれのアミノ酸番号-25~-238は共通配列として存在している。

- 10 配列番号10に示すアミノ酸配列は、アミノ酸457個から成るhBSSP2タンパク質であり、それをコードする配列番号9に示す塩基配列は塩基数1371からなる。配列番号10のアミノ酸番号-217~-1は、膜貫通領域およびスカベンジャーレセプターシステインリッチ様ドメインが存在しているため、hBSSP2は成熟体となって活性を示すだけでなく、アミノ酸番号-217~-1が付加した形態で活性を示すことも考えられる。

- 15 なお、一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2、4、6、8または10のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さら
- 20 に、配列番号2、4、6、8または10のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および/または挿入を含むと解する。特に、配列番号2に示すBSSP2成熟型タンパク質のN末端アミノ酸に数個のアミノ酸を付加あるいは欠失等の改変をさせても、活性が保持されることを
- 25 本発明者らは証明している。

すなわち、本発明のタンパク質には配列番号2、4、6、8または10のいずれかに記載のアミノ酸配列、さらに、配列番号1、3、5、7または9に示したいずれかの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列またはこれらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入

されたアミノ酸配列を含み、セリンプロテアーゼファミリーに属するタンパク質が含まれる。

所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43, 1981)。従って、コドンの縮重を考慮して塩基配列を適宜改変したものもまた本発明の塩基配列に含まれる。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的変異導入法 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662, 1984) 等に従って行うことができる。

さらに、配列番号1、3、5、7または9のいずれかに記載の塩基配列を含む塩基配列またはそれらに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質が本発明によるBSSP2と同等の性質を有する限り、そのDNAは本発明によるDNAに含有される。ストリンジントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。本発明におけるストリンジントな条件とは、例えば、5×SSC、5%デナハート溶液 (0.1% BSA、0.1% Ficoll 400、0.1% PV P)、0.5% SDSおよび20 μg/ml 変性サケ精子DNAを含有する溶液中で、37℃にて一夜インキュベートし、ついで室温にて0.1% SDS含有2×SSCで洗浄する条件である。SSCの代わりに適宜SSPEを使用してもよい。

配列番号1、3、5、7または9のいずれかに記載の塩基配列に基づいて、BSSP2遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用するこ

とができる。あるいはPCRの様な核酸の合成反応に利用することができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも10塩基、好適には15～50塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは100塩基から全長の長さであることが望ましい。

5       さらに、本発明が提供するBSSP2のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するBSSP2遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域と  
10       は転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5' 非翻訳領域、または3' 非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

本発明はまた、配列番号1に示す塩基配列もしくは配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号3に示す塩基配列もしくは配列番号4のアミノ  
15       酸配列をコードする塩基配列、配列番号5に示す塩基配列もしくは配列番号6のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号7に示す塩基配列もしくは配列番号8のアミノ酸配列をコードする塩基配列、または配列番号9に示す塩基配列もしくは配列番号10のアミノ酸配列をコードする塩基配列、あるいは、これらに類似する塩基配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ここで特定の塩  
20       基配列に類似する塩基配列とは、上記したストリンジェントな条件下で特定の塩基配列またはこれに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

ベクターは例えば、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac  
25       4.5、pcDNA3.1、pSecTag2、Novagen社製のpET、pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBluescriptIIもしくはFarmacia社製のpGEX、pUC18/19、PfasterBAC1 (GIBCO社製) 等、本発明のタンパク質を発現し



得るベクターであれば特に限定されないが、好ましくは、実施例記載の p C R I  
I - T O P O ベクター、および、商業的に入手し得る発現ベクター、例えば p S  
e c T a g 2 A ベクター、p S e c T a g 2 B ベクター ( I n v i t r o g e n  
社) を用い、自体公知の方法で本発明のタンパク質の分泌に適した分泌シグナル  
5 塩基配列と、その 3' 下流側に、T a g 塩基配列、切断可能塩基配列および本発  
明の成熟体または活性型タンパク質をコードする塩基配列を挿入することができ  
るクローニング部位をこの順序に組み込んで構築したタンパク質発現ベクター  
(本願出願人による「タンパク質発現ベクターとその使用」についての同日付け  
特許出願明細書) を用いる。具体的には、分泌シグナルとして、トリプシンシグ  
10 ナル、T a g 塩基配列としてポリヒスチジンをコードする塩基配列、切断可能塩  
基配列として、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする塩基配列であ  
る、アミノ酸配列 A s p - A s p - A s p - A s p - L y s をコードする塩基配  
列 (当該アミノ酸配列はエンテロカイネースにより認識され、その C 末端部分に  
おいて、組換え融合タンパク質が切断される。) を用いることが好ましい。

15 さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩  
基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転  
換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、  
本発明の発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、細胞  
外に分泌することが可能な全ての細胞 (微生物を含む) が挙げられる。

20 本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細  
胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、C H O 細胞、C O S  
細胞、B H K 細胞、V e r o 細胞、ミエローマ細胞、H E K 2 9 3 細胞、H e L  
a 細胞、J u r k a t 細胞、マウス L 細胞、マウス C 1 2 7 細胞、マウス F M 3  
A 細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S 2、S f 9、S f 2 1、H  
25 i g h F i v e <sup>TM</sup> (登録商標) 細胞等がある。本明細書における微生物とは、  
大腸菌もしくは酵母等が含まれる。

本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融  
合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タ  
ンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質の N 末端側または /

およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。本明細書における組換えタンパク質とは、目的タンパク質をコードする核酸配列を本発明の発現ベクターに組み込み、発現された組換え融合タンパク質から目的タンパク質をコードする核酸由来でないアミノ酸配列を切断したものであり、実質的に本発明のタンパク質と同義語である。

上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP2もしくはmBSSP2を採取する、hBSSP2もしくはmBSSP2の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

本発明は、また、本発明の新規なセリンプロテアーゼの阻害剤にも関する。阻害剤のスクリーニングは、候補化合物と接触させた酵素の活性を、候補化合物と接触させていない酵素の活性と比較する等の自体公知の方法により行うことができる。

本発明は、hBSSP2もしくはmBSSP2遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、hBSSP2もしくはmBSSP2遺伝子とは、hBSSP2もしくはmBSSP2をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、hBSSP2もしくはmBSSP2の機能あるいは発現調節の研究、hBSSP2もしくはmBSSP2が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異

の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、BSP2の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターまたはアデノウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のFLPリコンビナーゼ系等によるin vivoにおける部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例

えば、以下に示すようにして行われる。

まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変わることが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約10～15個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、尾の先端部からゲノムDNAを抽出し、サザン法あるいはPCR法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくはRT-PCR法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

本発明のノックアウトマウスは、mBSSP2遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来

の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

本発明はまた、hBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2、4、6、8または10のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。hBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

本発明のhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6

およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化hBSSP2もしくはmBSSP2と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495, 1975)やその変法(J. Immunol. Method, 39, 285, 1980; Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981; Nature, 285, 446, 1980)に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOを添加することもできる。

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗hBSSP2もしくはmBSSP2抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、hBSSP2もしくはmBSSP2抗原を直接または担体と共に吸着させた固相(例えば、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合した抗hBSSP2もしくはmBSSP2モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したhBSSP2もしくはmBSSP2を加え、固相に結合した

抗hBSSP2もしくはmBSSP2モノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

5 抗hBSSP2もしくはmBSSP2モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗BSSP2抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素免疫測定法（ELISA）法、FIA（蛍光イムノアッセイ）法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

10 15

#### ELISA法によるスクリーニング

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

20 25

クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で

行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニプレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する(J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982) ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。フラスコ内で培養を行う場合は、0~20%のFCSを含む細胞培養用培地(IMDM、DMEM、RPMI 1640およびMEM等)を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1~2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

本発明によるモノクローナル抗体は、hBSSP2もしくはmBSSP2に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7~20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2、4、6または8のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるBSSP2特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2、4、6、8および10に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、BSSP2ファミリーに共通のエピト



ープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

5 抗hBSSP2もしくはmBSSP2モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくは  
10 プロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05～2%の濃度で添加する。その他、グリシン、 $\alpha$ -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。IgM抗体の  
15 場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 $\beta$ -プロピオニラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の  
20 製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリア  
25 とハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレ

イミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

hBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、hBSSP2もしくはmBSSP2を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明のhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片との免疫学的な結合に基づき、hBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化hBSSP2もしくはmBSSP2と検体中のhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片を測定する競合法を利用して検体中のhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片を測定する方法が挙げられる。

サンドイッチ法によるhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体とhBSSP2もしくはmBSSP2またはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-hBSSP2もしくはmBSSP2標識化抗体を形成させる2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体およびhBSSP2もしくはm

BSSP 2 またはその断片を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

5 測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

10 抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる 2 種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第 3 の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

20 標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター 5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、  
25 蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、

ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として $\text{H}_2\text{O}_2$ を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイノージー ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したものも含まれる。

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばFab', Fab, F(a

b') 2を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、BSSP 2もしくはその断片を含む試料またはBSSP 2の前駆体もしくはその断片を含む試料であれば限定されない。

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1 新規セリンプロテアーゼmBSSP 2遺伝子のクローニング

mouse brain cDNA library (Clontech社)を鋳型にして、プライマー配列1; GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG (配列番号20)、2; CCV CTR WSD CCN CCN GGC GA (配列番号21)に示すセリンプロテアーゼに共通のアミノ酸に対応する核酸配列のプライマーを用いたPCR法でクローニングを行った。すなわち鋳型を5  $\mu$ l、10 $\times$ ExTaqバッファーを5  $\mu$ l、dNTPを5  $\mu$ l、上記プライマーを各10 pmol、ExTaq (TAKARA社製)を0.5  $\mu$ l加え滅菌水で全量を50  $\mu$ lとし、94 $^{\circ}$ Cにて0.5分、55 $^{\circ}$ Cにて0.5分、72 $^{\circ}$ Cにて1分のサイクルで30回PCRを行った。このPCR産物をTOPO TAクローニングキット(Invitrogen社)添付のPCR II-TOPOベクターと混ぜ、室温で5分間放置した。その後常法通りにキット添付の大腸菌Top 10に形質転換し、LB (Amp+)プレート(100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有する)に播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、蛍光シーケンサー(ABI社)を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。得られた各クローンの配列をGenBankで相同性を調べ、未知であったクローン、BSSB 2遺伝子について5' RACE、3' RACE法によりcDNA全長を得、上記法と同じく塩基配列の決定を行った。すなわち、BSSP 2クローン特異プライマー、GSP1プライマー(mBSSP2.2 (配列番号2

7) またはmBSSP2.0 (配列番号22))、およびGSP2プライマー (mBSSP2R2 (配列番号28) またはmBSSP2.1 (配列番号23)) を作製し、mouse brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を用いてこの試薬に付属するAP1プライマーと上記GSP1プライマーのいずれかで94℃、2分を1サイクル、94℃にて30秒、60℃にて30秒、72℃にて30秒を35サイクルするPCRを行った。次に、このPCR産物を1/100に希釈したものを5μl、10×バッファーを5μl、dNTPを5μl、10μMの上記GSP2プライマーのいずれかを10pmol、試薬に付属するAP2プライマーを10pmol、ExTaqを0.5ユニット、滅菌水で全量を50μlとし、先と同様にPCRを行った。このPCR産物を上記TOPO TAクローニングキットを用いてクローニングし、シークエンスを行い前記クローンの上流、下流領域を得た。この際、タンパク質の全長をカバーしていないと思われるクローンについては更に、新たに判明した塩基配列に基づいて下記に示す特異的プライマーを作製した。またこの配列を基にしてORFを増幅できるような下記に示すプライマー (mBSSPF7 (配列番号26)、mBSSP2R5/E (配列番号29)) を作製し、mouse brain Marathon-ready cDNAを鋳型としてPCRを行い同一クローンであることを確認し、これをTOPO TAクローニングキットに添付のpCRII-TOPOベクターにクローニングし、全長のcDNAクローンが入ったプラスミドpCRII/mBSSP2を得た。このプラスミド中に含まれるDNAの塩基配列を配列番号7に、この塩基配列から推定されるmBSSP2タンパク質のアミノ酸配列を配列番号8に示す。さらに、異なる2つのタイプのクローンも得られた。これらのDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号3および5に、これらの塩基配列から推定されるmBSSP2タンパク質のアミノ酸配列を配列番号4および6に示す。この新規プロテアーゼは、タイプ1、2および3に分類することができ、タイプ1はアミノ酸273個から成り、タイプ2はアミノ酸311個から成り、タイプ3はアミノ酸445個から成る。これらのアミノ酸配列中には成熟体セリンプロテアーゼとしてN末端側がIle-Val-Gly-Gly-Gln-Ala-Valから始まる238個のアミノ酸配列を共通して含有していた。また、成熟型のセリンプロテアーゼのアミノ酸配列中には、セリンプロテアーゼ

の活性を有するコンセンサス配列が含有されており、また、糖鎖結合部位に特有のアミノ酸配列が2カ所以上存在していることから、該アミノ酸配列から少なくとも糖鎖は2カ所以上存在しているものと予想される。

表 1

配列番号	プライマー名	向き	配 列	用途
2 2	mBSSP2.0	Forward	ATGGTGGAGAAGATCATTCCT	RACE
2 3	mBSSP2.1	Forward	TACAGTGCCCAGAACCATG	RACE
2 4	mBSSPF4	Forward	CTCAACTCTCTGCTAGACCG	RACE
2 5	mBSSP2F5	Forward	ATAGTTGGCGGCCAAGCTGT	mature
2 6	mBSSPF7	Forward	CCCAGCAGAACTTACTGCCT	全長用
2 7	mBSSP2.2	Reverse	TGTTGCAGAGGTGGGTGCTG	RACE
2 8	mBSSP2R2	Reverse	TACCATTGTGTCCTGCAGTGT	RACE
2 9	mBSSP2R5/E	Reverse	TGAATTCTGCTGCTTCTTCGGCTAGCG	全長用

## 実施例2 mBSSP2遺伝子のマウス臓器での発現

B a l b / c マウスあるいはその胎児の各種臓器から、QuickPrep Micro mRNA purification Kit (Amersham-Pharmacia) のプロトコルに従い、mRNAを単離した。これらを常法通りに電気泳動し、ナイロンメンブランに転写した。このフィルターを p C R 1 1 / m B S S P 2 より m B S S P 2 の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 $\alpha$ - $^{32}$ P d C T P で標識したプローブを  $5 \times S S C$  で希釈したものと、 $65^{\circ}\text{C}$  で一昼夜反応させた。その後、このフィルターを  $2 \times S S C / 0.1\%$  SDS で室温30分間、 $1 \times S S C / 0.1\%$  SDS で室温30分間、 $0.1 \times S S C / 0.1\%$  SDS で  $65^{\circ}\text{C}$  30分間で2回洗い、F L A 2000用イメージングプレート（富士フィルム社）に1日露光させ、解析した。マウス胎児の頭から調製したmRNA、生後5日、10日、14日、18日、30日、3ヶ月、7ヶ月、1年のマウスの脳から調製したmRNA（図1）、および、生後3ヶ月のマウスの各種臓器から調製したmRNA（図2）を用いて行った結果を示す。また上記で作製したマウスmRNAをReady To Go RT-PCR

Beads (Amersham-Pharmacia) を用いてキット添付のプロトコール通りに mBSSSP 2 について遺伝子特異的プライマー (配列番号 25、29) を用いて RT-PCR を行った。

5 図1および図2から、mBSSSP 2 はノザンブロット解析の場合、15-20 日目の胎児の頭で発現を示し、生後3ヶ月のマウスでは、前立腺および精巣で発現を示すことが認められた。また RT-PCR の結果、生後12日の脳および生後3ヶ月の精巣で発現が認められた。

実施例3 mBSSSP 2 遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の発現

10 (1) 発現プラスミドの構築

プラスミド pCR 11 / mBSSSP 2 をテンプレートに、BSSSP 2 タンパク質の成熟体をコードする cDNA 領域を PCR 反応にて増幅した (配列番号 25 および 29 の配列を有するプライマーを用い、配列番号 1 の塩基番号 1~717 の部分を増幅した)。この PCR 産物を pTrc-His B (Invitrogen) を BamHI で消化後、マングベーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法通りにライゲーションし、大腸菌 JM109 を形質転換させ、生じたコロニーを PCR 法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミド pTrcHis / mBSSSP 2 を含む大腸菌を得た。

20 得られた大腸菌は、E. coli pTrcHis / mBSSSP 2 と命名し、1998年10月29日より、受託番号 FERM P-17033 の下、日本国茨城県つくば市東1丁目1-3 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託してある。

(2) 発現プラスミドを含む大腸菌でのタンパク発現

25 発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを 10 ml の LB (Amp+) 培地に接種し、一晚 37°C で培養した。これを 250 ml の LB (Amp+) 培地に接種し、37°C で培養した。600 nm の吸光度が 0.5 になった時、250  $\mu$ l の 0.1 M IPTG (イソプロピルー  $\beta$ -D (-) チオガラクトピラノシド) を加え、更に5時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バッファー (10 mM リン酸バッファー pH 7.5、1 mM EDTA) で懸濁し、氷上で超音波処理



を行うことで大腸菌を破壊し、14,000rpm、4℃で20分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を0.5% Triton X-100を含む菌体破壊バッファで2度洗浄し、Triton X-100を取り除くために水洗した後に8Mの尿素を含む変性バッファ（8M 尿素、50mM Tris pH8.5、20mM 2ME）で37℃で1時間浸透することで溶解した。この溶解液をTALON metal affinity resin (Clontech)に通し、10mMイミダゾール含有変性バッファで洗浄後、100mMイミダゾール含有変性バッファで溶出し、精製した。この精製物をPBSに対して一晩おきにバッファ交換しながら3日間透析し、タンパク質mBSSP2-Hisを得た。

10 実施例4 mBSSP2 遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質のpFBTrypSigTag/BSSP2を用いた発現

(1) pFBTrypSigTag/BSSP2の作製

15 配列番号11と12をアニールさせてNheIとBamHI消化したフラグメントをNheI-BamHI消化したpSecTag2A (Invitrogen社製)に挿入し、pSecTrypHisとした。5μgのpSecTrypHisベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ（宝酒造）を加えて室温（25℃）で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のXhoIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位の細菌アルカリホスファターゼ（宝酒造）を加えて65℃で30分反応した。

20 特開平9-149790またはBiochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997に記載されている方法に準じて、COLO201細胞よりmRNAを調製し、cDNAを合成し、プラスミドpSPORT/ニューロシンを得た。pSPORT/ニューロシンより、配列番号13および14の配列を有するプライマーを用いてPCRを行い、ニューロシン活性型領域のcDNAを得た。このPCR産物の3'側のXhoIサイトを10単位のXhoIで、37℃、3時間反応させることにより切断した。これとpSecTrypHisをTAKARA ライゲーションキットを用いて挿入し、pSecTrypHis/ニューロシンを得た（図3）

5 配列番号15及び16の配列を有するプライマーを用いてpSecTrypHis/ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識部位までの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをpSecTag2AのNheIとHindIIIサイトに挿入しプラスミドpTrypSigを作製した。

10 プラスミドpSecTag2Aの1 $\mu$ g (0.1 $\mu$ l)を制限酵素NheIおよびBamHIで処理することにより、IgGkのリーダー配列をコードする領域を完全に除去した。この溶液に対して、配列番号40および41の配列を有するDNAをそれぞれ100pmoleづつ加え、70℃で10分間熱処理した後室温で30分間放置してアニーリングした。NheIとBamHIで処理したHis分泌シグナル配列とpSecTag2A 1 $\mu$ lづつにDNAライゲーションキットVer. 2 (宝酒造株式会社)のI液を2.0 $\mu$ l加え、16℃で、30分間反応させた。

15 反応液に大腸菌コンピテントセルXL1-Blue (STRATAGENE社) 0.1mlを加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地 (東洋紡績株式会社) を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁し、1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアmpiシリンを含むアmpiシリンLBプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち、His分泌シグナルのDNAが挿入されているものをPCRで選択し、それをpTrypHisとした。

20 pTrypHisのHis Tag領域を含むおよそ200bpを配列番号16及び17の配列を有するプライマーによって増幅し、HindIIIとBamHIによる消化で生じたHis Tagとエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ40bpの断片をpTrypSigに挿入してpTrypSigTagを作製した (図4A)。

25 pTrypSigTagのトリプシンシグナル配列からエンテロキナーゼ認識部位までを配列番号14と18の配列を有するプライマーを用いたPCRによ

って作製したcDNAをBglIIIとBamHI消化によって切り出し、pFastBAC 1のBamHIサイトに挿入した。挿入方向を配列番号14と19の配列を有するプライマーを用いたPCRによって確認し、ポリヘドリンプロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、pFBTrypSig Tagとした。

5  $5\mu\text{g}$ のpFBTrypSigTagベクターに対して20単位のBamHIを加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温( $25^{\circ}\text{C}$ )で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のEcoRIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位の細菌アルカリホスファターゼ(宝酒造)を加えて $65^{\circ}\text{C}$ で30分反応した。

10 E. coli pTrcHis/mBSSP2 (寄託番号FERM P-17033) から調製したpTrcHis/mBSSP2またはpCRII/mBSSP2を用い、通常の方法でPCRを行い、mBSSP2の活性体領域のcDNAを得た。得られたcDNAをpFBTrypSigTagに挿入しpFBTrypSigTag/mBSSP2を得た(図4B)。この際、塩基配列を決定することにより、正しくmBSSP2が挿入されているかを確認した。

15 pFBTrypSigTag/mBSSP2をGibco BRL BAC-TO-BAC バキュロウイルス発現系のプロトコールに従ってバクミドDNA上にトリプシノーゲンシグナルペプチド、ヒスタグ及びエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラhBSSP2を持つ組み換えバクミドを作製した。これをBAC-TO-BAC バキュロウイルス発現系のマニュアルに従いSf-9細胞で発現させたところ、ウイルス感染後2日目より培養上清中に分泌された。

## (2) 酵素活性の測定

25 この培養上清中に得られた組換え融合タンパク質mBSSP2をキレートカラムに通し精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清をPBSバッファーを用いてキレートカラム(Ni-NTA-Agarose, Qiagen社製)に供し、PBSにイミダゾール(和光純薬工業)を溶解した溶液で段階的に溶出した。得られたイミダゾール溶出分画を、さらにPD-10カラム(Pharmacia社製)でPBSバッファーに交換した。このサンプル $50\mu\text{L}$ にエ

ンテロキナーゼ (1 U / 1  $\mu$  L, Invitrogen社製) 10  $\mu$  Lを混和し、室温で60分反応させた。次に各種合成基質 (ペプチド研究所; Boc-Gln-Ala-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、Bz-Arg-MCA、Boc-Val-Leu-Lys-MCA、Pyr-Gly-Arg-MCA、Pro-Phe-Arg-MCA、Boc-Val-Pro-Arg-MCA、Z-Arg-Arg-MCA、Arg-MCA、Z-Phe-Arg-MCA) をDMSOに溶解し、1 M Tris-HCl, (pH 8.0) で希釈した0.2 M基質溶液を50  $\mu$  L加え、さらに、37°Cで反応した。1時間後に励起波長380 nm、蛍光波長460 nmにおける、酵素作用に生じるAMC (7-アミノ-4-メチルクマリン) の蛍光を測定することにより、活性を測定した。

その結果、組換え融合タンパク質mBSSP2は、セリンプロテアーゼ活性を有することが示された。

#### 実施例5 hBSSP2遺伝子のクローニング

1  $\mu$  gのヒト胎児脳mRNA (Clontech社) をSuperscript II (Gibco BRL社) を用いてoligo dT-Not Iプライマー (5' GGCCACGCGTCGACTAGTA C(T)<sub>17</sub> 3') にて逆転写反応を行い、cDNAを得た。これを鋳型にmBSSP2の塩基配列から作製した配列番号30および配列番号31をプライマーに用いてPCRを行い、hBSSP2のcDNA断片を得た。すなわち鋳型を5  $\mu$  l、10 x Ex Taqバッファーを5  $\mu$  l、dNTPsを5  $\mu$  l、上記プライマーを各10 pmol、Ex Taq (宝酒造社) を0.5  $\mu$  l加え滅菌水で全量を50  $\mu$  lとし、94°Cにて0.5分、55°Cにて0.5分、72°Cにて1分のサイクルで35回PCRを行った。以下のPCR反応は鋳型とプライマー以外はこの反応組成と同様に、同条件で行った。このPCR産物をpGEM-T Easyベクター (Promega社)、Takara Ligation solution I (宝酒造社) と混ぜ、16°C、2時間反応した。その後常法通りに大腸菌JM109に形質転換し、LB (amp<sup>r</sup>) プレートに播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、ジデオキシシル法による塩基配列の決定を行った。mBSSP2と相同性を示したクローンについて5' RACE、3' RACE法によりcDNA全長を得て上記と同じく塩基配列の決定を行った。3' RACEは、先のcDNAを鋳型に配列番号30と37の配列を有するプライマーとでPCRを行い、これを1/100に希釈したものを鋳型に配列番号32と37をプライマーにPCRを行った。5'

RACEについては、ヒト胎児脳mRNA (Clontech社) をSuperscript IIとSMART RACE cDNA amplification kit (Clontech社) 用いてRACE用のcDNAを作製した。このcDNAに対してキットに付属する10×Universal Primer Mix (キットに添付) のプライマーと配列番号33プライマーでPCRを行った後、このPCR産物を1/100に希釈したもの鑄型に Nested PCR Primer (キットに添付) と配列番号34をプライマーとしてPCRを行った。最終的に得たPCR産物を上記のようにTAクローニングし、塩基配列を決定して前記クローンの上流、下流領域を得た。またこの配列を基にしてcDNA全長を増幅できるようなプライマー配列番号35および36を作製し、先に合成したcDNAを鑄型としてPCRを行いpGEM-T Easyベクターにクローニングし、全長のcDNAクローンが入ったプラスミドpGEM-TE/hBSSP2を得た。このプラスミド中に含まれるDNAの塩基配列を配列番号9に、この塩基配列から推定されるhBSSP2タンパク質のアミノ酸配列を配列番号10に示す。

このプラスミドを含む大腸菌を、E. coli pGEM-TE/hBSSP2と命名し、1999年7月27日より、受託番号FERM P-17487の下、日本国茨城県つくば市東1丁目1-3通商産業省工業技術院生命工学工業技術院研究所に寄託してある。

表 2

配列番号	プライマー名	向き	配 列	用途
30	BSSP2SPF	Forward	ACTGCTGCCCCACTGCATG	一部用
31	BSSP2SPR	Reverse	CAGGGGTCCCCGCTGTCTCC	一部用
32	hBSSP2F11	Forward	GCTCTCAACTTCTCAGACAC	RACE
33	hBSSP2R12	Reverse	ACTCAGCTACCTTGGCGTAG	RACE
34	hBSSP2R11	Reverse	CCTGGAGCATATCCGAGCTG	RACE
35	hBSSP2F12	Forward	GCTTTACAACAGTGCTAC	全長用
36	hBSSP2R13/E	Reverse	TGGAATTCGAGGAAACAGCAGGACTCAG	全長用
37			TACTAGTCGACGCGTGGCC	

#### 実施例6 ノーザン法によるhBSSP2 mRNAの検出

ヒト成人および胎児の各組織から抽出したpolyA+RNAをブロットしたメンブラン (Clontech社) に対してhBSSP2特異的プローブを用いてノーザンハイブリダイゼーションをおこなった。プローブは完全長のhBSSP2を鋳型に配列番号34と35をプライマーに増幅したcDNA断片を用い、Takara BcaBEST random labeling kit (宝酒造) を用いてランダムプライミング法によって標識した。ハイブリダイゼーションは60℃で一晩行い、フィルターは最終的に室温で0.1×SSC、0.1% SDSで洗浄した。放射活性はFLA-2000 (富士フイルム社) で検出した。hBSSP2 mRNAに対するシグナルは、成人脳ではおよそ2.4 kbに、成人の骨格筋では7 kbと1.3 kbに、さらに胎児肝臓では7 kbに認められた (図5)。成人脳のものは当該塩基配列に相当するものと考えられ、その他のものはスプライシングの違いによる多形と考えられる。

#### 実施例7 RT-PCRによるhBSSP2 mRNAの検出

Clontech社より購入したヒト組織のmRNAをReady To Go RT-PCR Beads (Amersham-Pharmacia) を用いてキット添付のプロトコール通りにhBSSP2に対してRT-PCRを行った (用いたプライマーを特定してください)。hBSSP2は脳、骨格筋で発現が認められた (図6)。脾臓ではプライマーの組み合わせによって明確なバンドが得られず、これは、脾酵素として大量に存在するセリンプロテアーゼによる非特異的な増幅と考えられる。

#### 実施例8 バキュロウイルス系によるhBSSP2の発現

pFastBac1 (GibcoBRL) にヒトトリプシノーゲン2のシグナル配列および(His)6タグ、エンテロキナーゼ切断サイトをコードする配列を挿入したプラスミドpFBTrypSigTag (図4、B) に成熟体hBSSP2がインフレームになるように挿入した。配列番号38及び36により増幅したhBSSP2の成熟体部分をEcoRIで切断して、mBSSP2と同様の方法でpFBTrypSigTagに挿入して、pFastBacTrypSigTag/hBSSP2を作製した。この際、蛍光標識した配列番号39を用いて塩基

配列を決定することにより、正しくBSSP2が挿入されているかを確認した。  
 pFBTrypSigTag/hBSSP2をGibco BRL BAC-TO-BAC バキュロ  
 ウイルス発現系のプロトコールに従ってバクミドDNA上にトリプシノーゲンシ  
 グナルペプチド、ヒスタグ、及びエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラB  
 SSP2を持つ組み換えバクミドを作製した。これをBAC-TO-BAC バキュロウイ  
 ルス発現系のマニュアルに従いSf-9細胞で発現させ、ウイルス感染後3日目  
 以降の培養上清に対して抗DDDDK抗体（入手先をご教示ください）を用いた  
 ウェスタン法を行ったところ、特異的なバンドが検出され、hBSSP2の発現  
 が確認された（図7）。

表3

配列番号	プライマー名	向き	配列	用途
38	hBSSP2F13	Forward	ACTGCTGCCCCACTGCATG	一部用
39	FBTrypsigtagF5		GCGCTAGCAGATCTCCATGAATCTACTCCTGATCC	塩基配列

#### 産業上の利用の可能性

本発明によって、単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ（hBSSP2およびmBSSP2）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体および多形性変種が提供される。さらに、本発明によって、hBSSP2およびmBSSP2タンパク質ならびにhBSSP2およびmBSSP2ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含有する組成物、それらの製造方法および使用が提供される。

## 配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 11: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

5 SEQ ID NO: 12: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

SEQ ID NO: 13: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

SEQ ID NO: 14: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

10 SEQ ID NO: 15: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

SEQ ID NO: 16: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

15 SEQ ID NO: 17: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypHis

SEQ ID NO: 18: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypSigTag

SEQ ID NO: 19: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pFBTrypSigTag

20 SEQ ID NO: 20: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

SEQ ID NO: 21: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

25 SEQ ID NO: 22: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2.0 for RACE for mBSSP2 (forward)

SEQ ID NO: 23: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2.1 for RACE for mBSSP2 (forward)

SEQ ID NO: 24: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4 for RACE for mBSSP2 (forward)



SEQ ID NO: 25: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2F5 to amplify mature mBSSP2-encoding region (forward)

SEQ ID NO: 26: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSPF7 to amplify full-length mBSSP2-encoding mRNA (forward)

5 SEQ ID NO: 27: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2.2 for RACE for mBSSP2 (reverse)

SEQ ID NO: 28: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2R2 for RACE for mBSSP2 (reverse)

10 SEQ ID NO: 29: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2R5/E to amplify full-length mBSSP2-encoding mRNA (reverse)

SEQ ID NO: 30: Designed oligonucleotide primer designated as BSSP2SPF to amplify a portion of hBSSP2 (forward)

SEQ ID NO: 31: Designed oligonucleotide primer designated as BSSP2SPR to amplify a portion of hBSSP2 (reverse)

15 SEQ ID NO: 32: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2F11 for RACE for hBSSP2 (forward)

SEQ ID NO: 33: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2R12 for RACE for hBSSP2 (reverse)

20 SEQ ID NO: 34: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2R11 for RACE for hBSSP2 (reverse)

SEQ ID NO: 35: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2F12 to amplify full length hBSSP2 (forward)

SEQ ID NO: 36: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2R13/E to amplify full length hBSSP2 (reverse)

25 SEQ ID NO: 37: Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP2

SEQ ID NO: 38: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2F13 to amplify a portion of hBSSP2 (forward)

SEQ ID NO: 39: Designed oligonucleotide primer designated as

FBTrpsigtagF5 to detect hBSSP2

SEQ ID NO: 40: Designed oligonucleotide to construct plasmid pT  
rypHis

5 SEQ ID NO: 41: Designed oligonucleotide to construct plasmid pT  
rypHis

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号2に示すアミノ酸238個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

5
2. 配列番号1の塩基番号1～714に示す塩基配列、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

10
3. 配列番号4に示すアミノ酸273個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

15
4. 配列番号3の塩基番号247～1065に示す塩基配列、配列番号4に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

20
5. 配列番号6に示すアミノ酸311個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

25
6. 配列番号5の塩基番号516～1448に示す塩基配列、配列番号6に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

7. 配列番号8に示すアミノ酸445個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号8に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

8. 配列番号7の塩基番号116～1450に示す塩基配列、配列番号8に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号8に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

9. 配列番号10のアミノ酸番号1～240に示すアミノ酸240個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号10のアミノ酸番号1～240に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号10のアミノ酸番号1～240に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

10. 配列番号9の塩基番号807～1526に示す塩基配列、配列番号10のアミノ酸番号1～240に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号10のアミノ酸番号1～240に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

11. 配列番号10のアミノ酸番号217～240に示すアミノ酸457個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号10のアミノ酸番号217～240に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号10のアミノ酸番号217～240に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

12. 配列番号9の塩基番号156～1526に示す塩基配列、配列番号10のアミノ酸番号217～240に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズ

し、かつ配列番号10のアミノ酸番号-217~240に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

13. 配列番号10のアミノ酸番号-217~-1に示すアミノ酸217個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号10のアミノ酸番号-217~-1に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号10のアミノ酸番号-217~-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

14. 配列番号9の塩基番号156~806に示す塩基配列、配列番号10のアミノ酸番号-217~-1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号10のアミノ酸番号-217~-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

15. 配列番号1に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号1に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

16. 配列番号3に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号3に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

20. 17. 配列番号5に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号5に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

25. 18. 配列番号7に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号7に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

19. 配列番号9に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号7に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

20. 請求項2、4、6、8、10、12、14~19のいずれか1つに記載

の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

21. 請求項2、4、6、8、10、12、14～19のいずれか1つに記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

5 22. 請求項2、4、6、8、15～18のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたmBSSP2を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

23. 請求項10、12、14または19のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP2を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

10 24. 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項22または23記載の製造法。

25. BSSP2遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

15 26. BSSP2遺伝子がBSSP2をコードするcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである請求項25記載のトランスジェニック非ヒト動物。

27. 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項25記載のトランスジェニック非ヒト動物。

28. BSSP2遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。

20 29. 請求項1、3、5、7、9、11または13のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

30. ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項29記載の抗体。

25 31. ヒト以外の温血動物に請求項1、3、5、7、9、11または13のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項1、3、5、7、9、11または13のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。

32. 請求項1、3、5、7、9、11または13のいずれか1つに記載のタ

ンパク質またはその断片に対する抗体と該タンパク質またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、検体中の該タンパク質またはその断片を測定する方法。

5 33. 請求項9、11または13のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と標識化抗体とにより、検体中のhBSSP2またはその断片を反応させ、生成したサンドイッチ錯体を検出する、検体中のhBSSP2もしくはその断片を測定する方法。

10 34. 請求項9、11または13のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して、標識化hBSSP2と検体中のhBSSP2またはその断片とを競合的に反応させ、抗体と反応した標識化hBSSP2の量から検体中のhBSSP2またはその断片の量を検出する、検体中のhBSSP2またはその断片を測定する方法。

35. 検体が体液である、請求項32～34のいずれか1つに記載の方法。

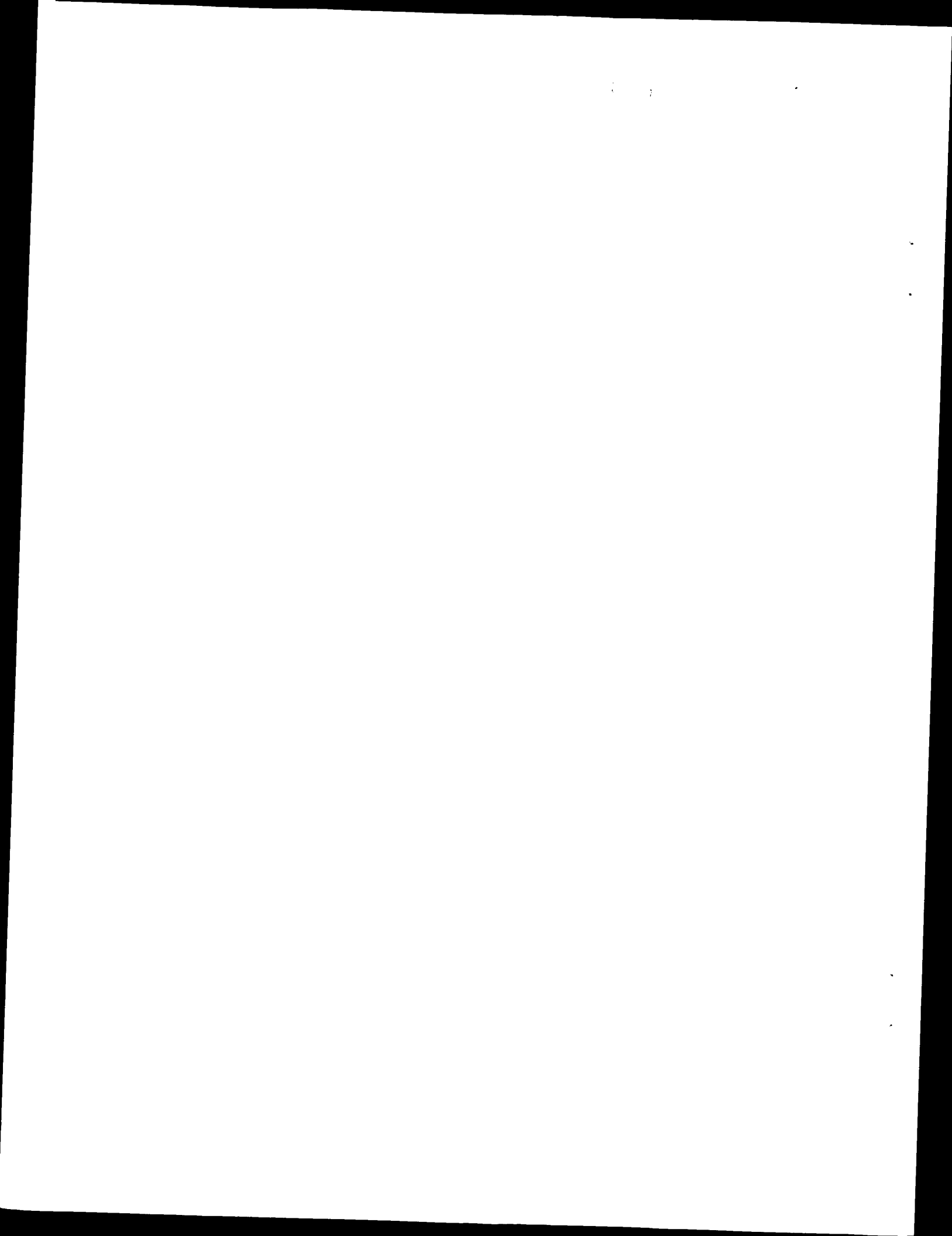
36. 請求項1、3、5、7、9、11または13のいずれか1つに記載のタンパク質を含む、組織における疾患の診断マーカー。

15 37. 脳におけるアルツハイマー病、てんかんの診断に用いる請求項36記載のマーカー。

38. 脳、前立腺または精巣における癌または炎症の診断に用いる請求項36記載のマーカー。

20 39. 精液または精子における不妊症の診断に用いる請求項36記載のマーカー。

40. 前立腺における前立腺肥大症の診断に用いる請求項36記載のマーカー。

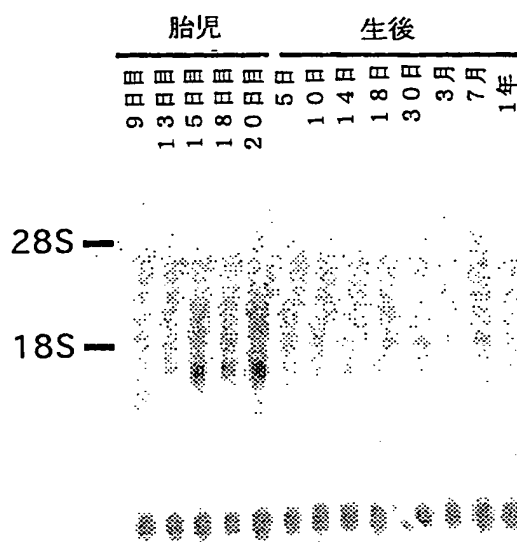




1/7

図 1

## mBSSP-2

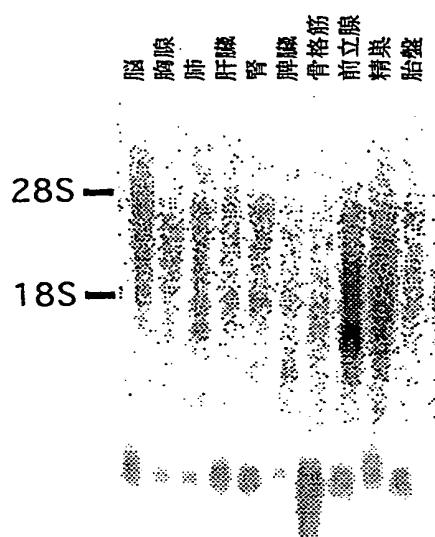




2/7

図 2

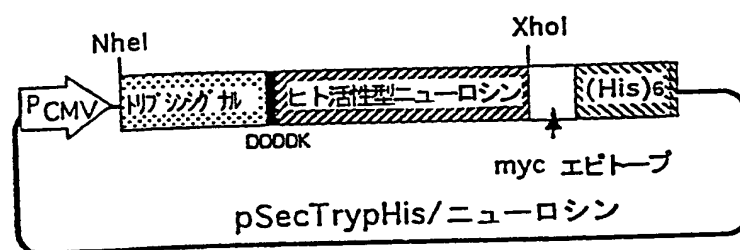
mBSSP-2





3 / 7

図 3





4 / 7

図 4

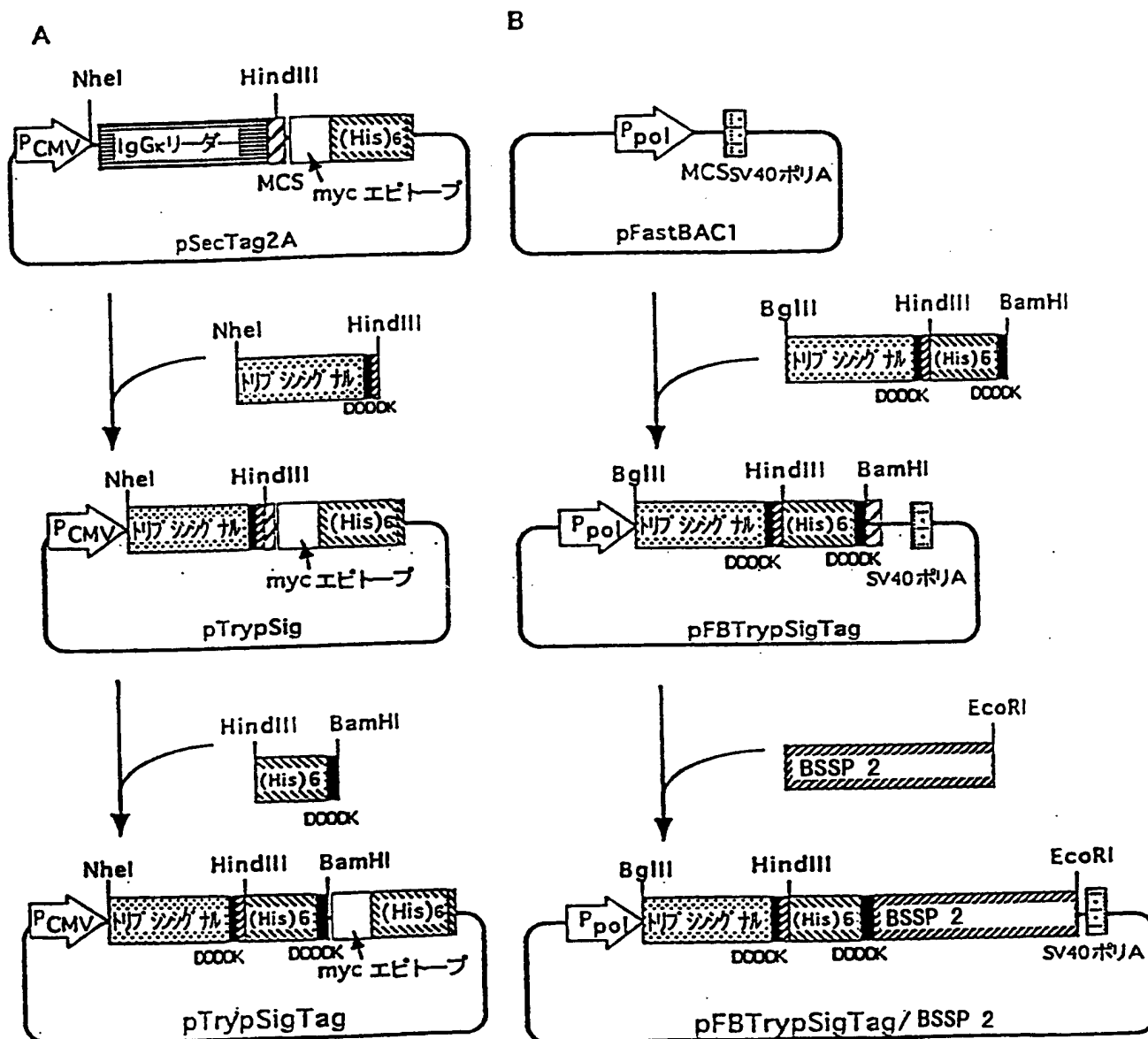
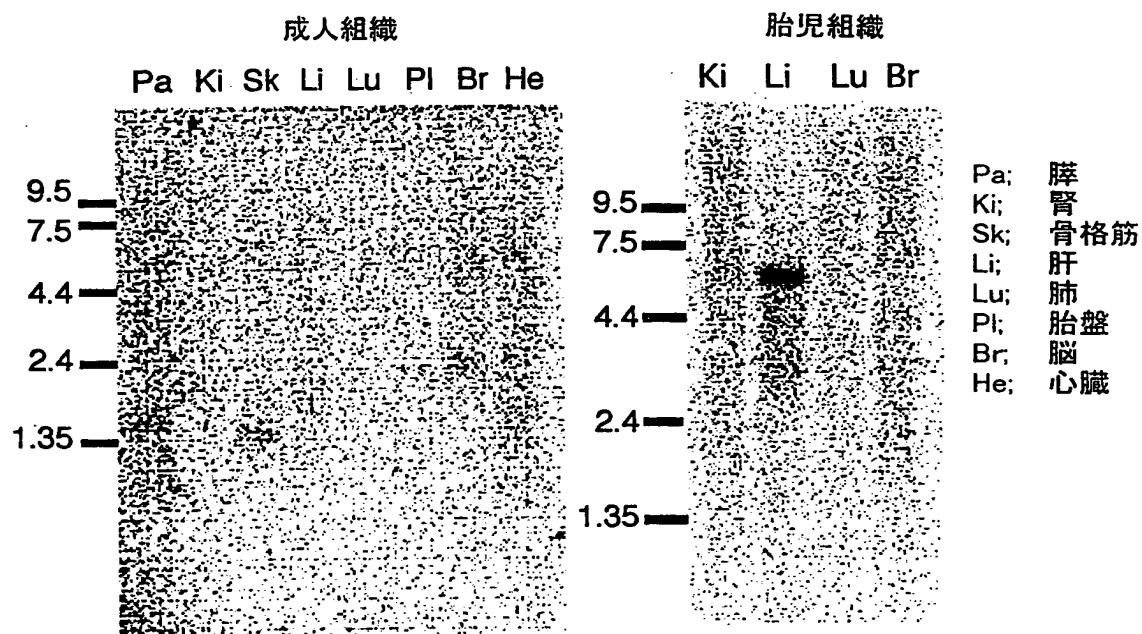






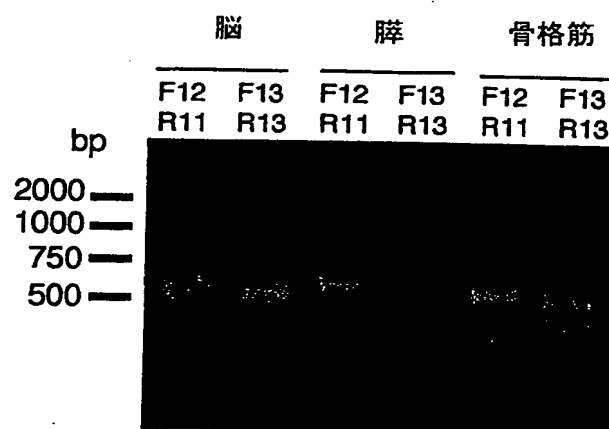
図 5

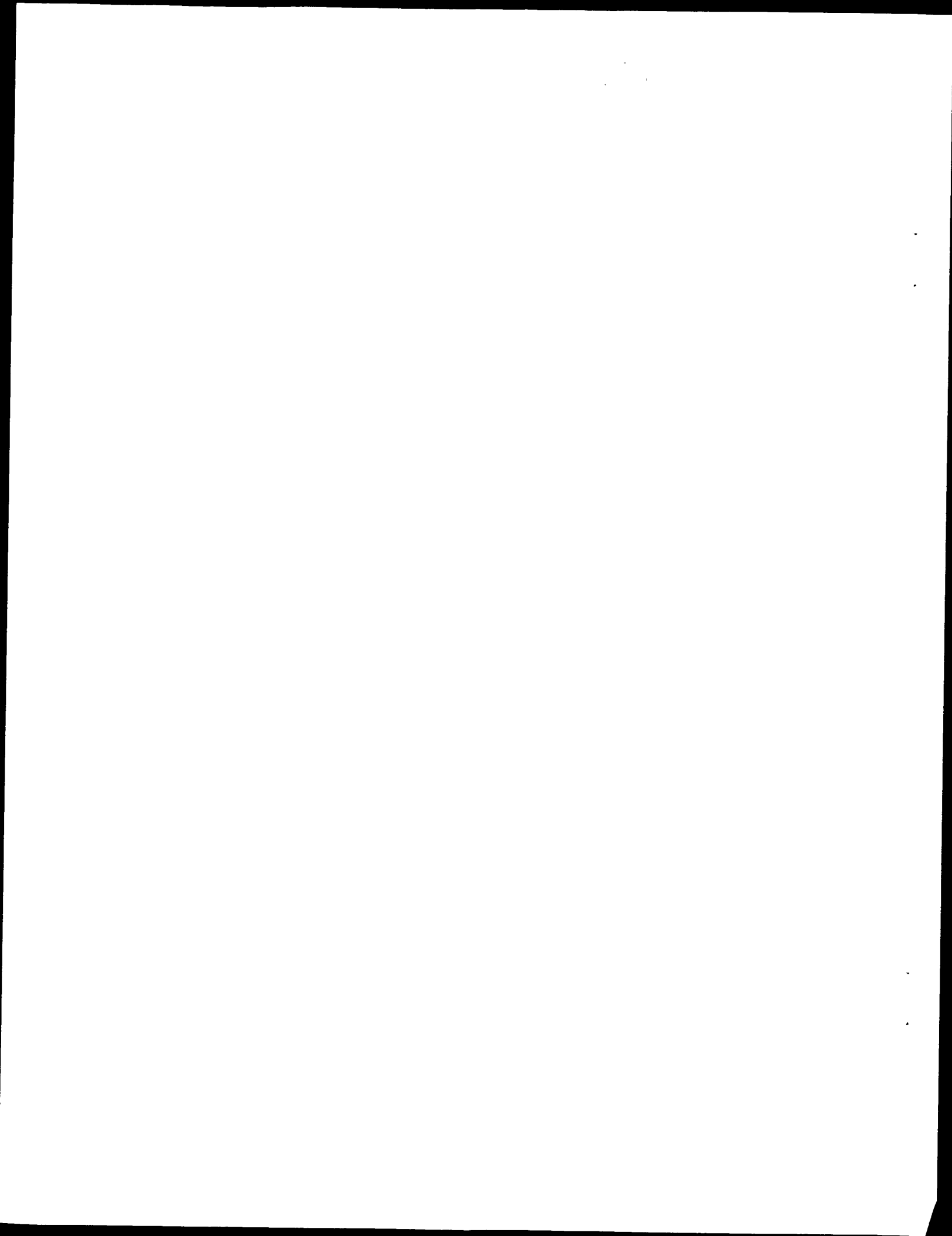




6/7

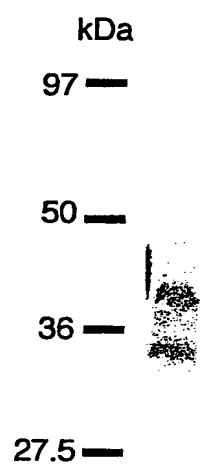
図 6





7/7

図 7





## SEQUENCE LISTING

<110> Fuso Pharmaceutical Industries Ltd.

5 <120> Novel serine protease BSSP2

<130> 661638

<150> JP 10-347785

10 <151> 1998-11-20

<160> 41

<210> 1

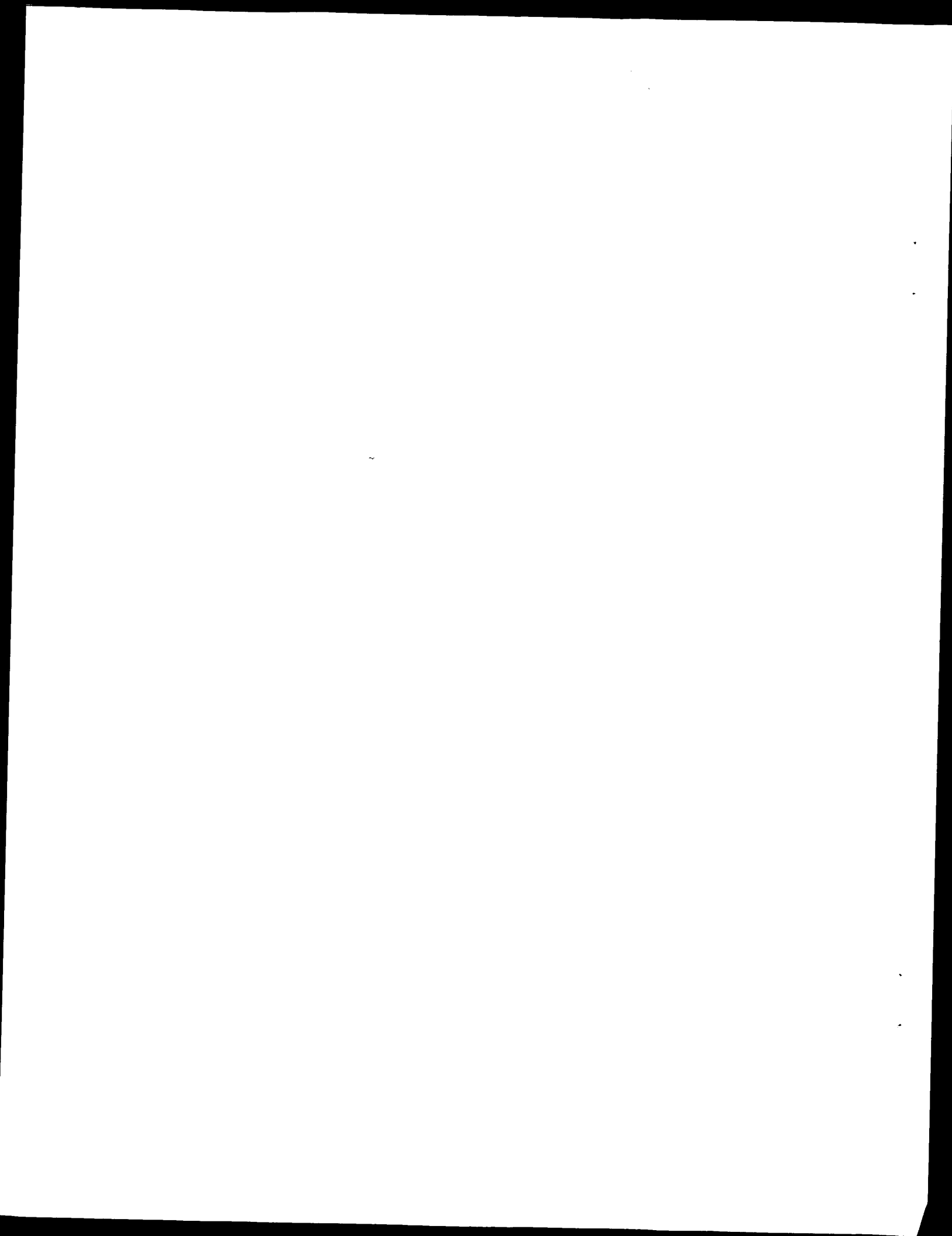
15 <211> 717

<212> DNA

<213> mouse

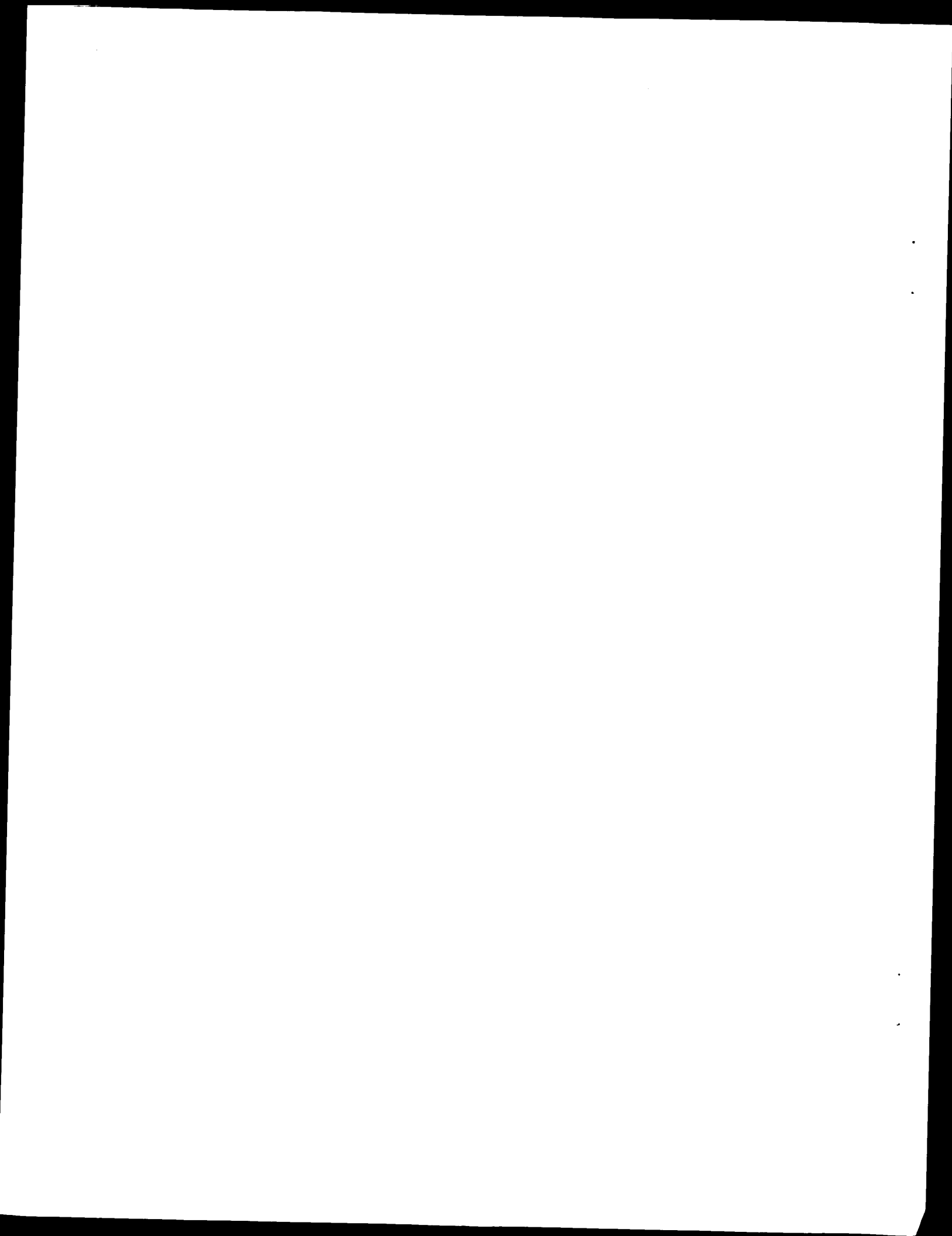
<400> 1

20	ata gtt ggc ggc caa gct gtg gct tct ggg cgc tgg cca tgg caa gct agc	51
	Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser	
	1                      5                      10                      15	
	gtg atg ctt ggc tcc cgg cac acg tgt ggg gcc tct gtg ttg gca cca cac	102
	Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala Pro His	
25	20                      25                      30	
	tgg gta gtg act gct gcc cac tgc atg tac agt ttc agg ctg tcc cgc cta	153
	Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser Arg Leu	
	35                      40                      45                      50	
	tcc agc tgg cgg gtt cat gca ggg ctg gtc agc cat ggt gct gtc cga caa	204





Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val Arg Gln  
                     55                    60                    65  
 cac cag gga act atg gtg gag aag atc att cct cat cct ttg tac agt gcc 255  
 His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala  
 5                    70                    75                    80                    85  
 cag aac cat gac tat gat gtg gct ctg ctg cag ctc cgg aca cca atc aac 306  
 Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro Ile Asn  
                     90                    95                    100  
 ttc tca gac acc gtg gac gct gtg tgc ttg ccg gcc aag gag cag tac ttt 357  
 10 Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln Tyr Phe  
                     105                    110                    115  
 cca tgg ggg tgc cag tgc tgg gtg tct ggc tgg ggc cac acc gac ccc agc 408  
 Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp Pro Ser  
 120                    125                    130                    135  
 15 cat act cat agc tca gat aca ctg cag gac aca atg gta ccc ctg ctc agc 459  
 His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu Leu Ser  
                     140                    145                    150  
 acc cac ctc tgc aac agc tca tgc atg tac agt ggg gca ctt aca cac cgc 510  
 Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr His Arg  
 20                    155                    160                    165                    170  
 atg ttg tgt gct ggc tac ctg gat gga agg gca gac gca tgc cag gga gac 561  
 Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp  
                     175                    180                    185  
 agc ggg gga ccc ctg gta tgt ccc agt ggt gac acg tgg cac ctt gta ggg 612  
 25 Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu Val Gly  
                     190                    195                    200  
 gtg gtc agc tgg ggt cgt ggc tgt gca gag ccc aat cgc cca ggt gtc tat 663  
 Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr  
 205                    210                    215                    220



gcc aag gta gca gag ttc ctg gac tgg atc cat gac act gtg cag gtc cgc 714

Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln Val Arg

225

230

235

tag

717

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 238

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

10

&lt;400&gt; 2

Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser

1

5

10

15

Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala Pro His

15

20

25

30

Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser Arg Leu

35

40

45

50

Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val Arg Gln

55

60

65

20

His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala

70

75

80

85

Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro Ile Asn

90

95

100

Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln Tyr Phe

25

105

110

115

Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp Pro Ser

120

125

130

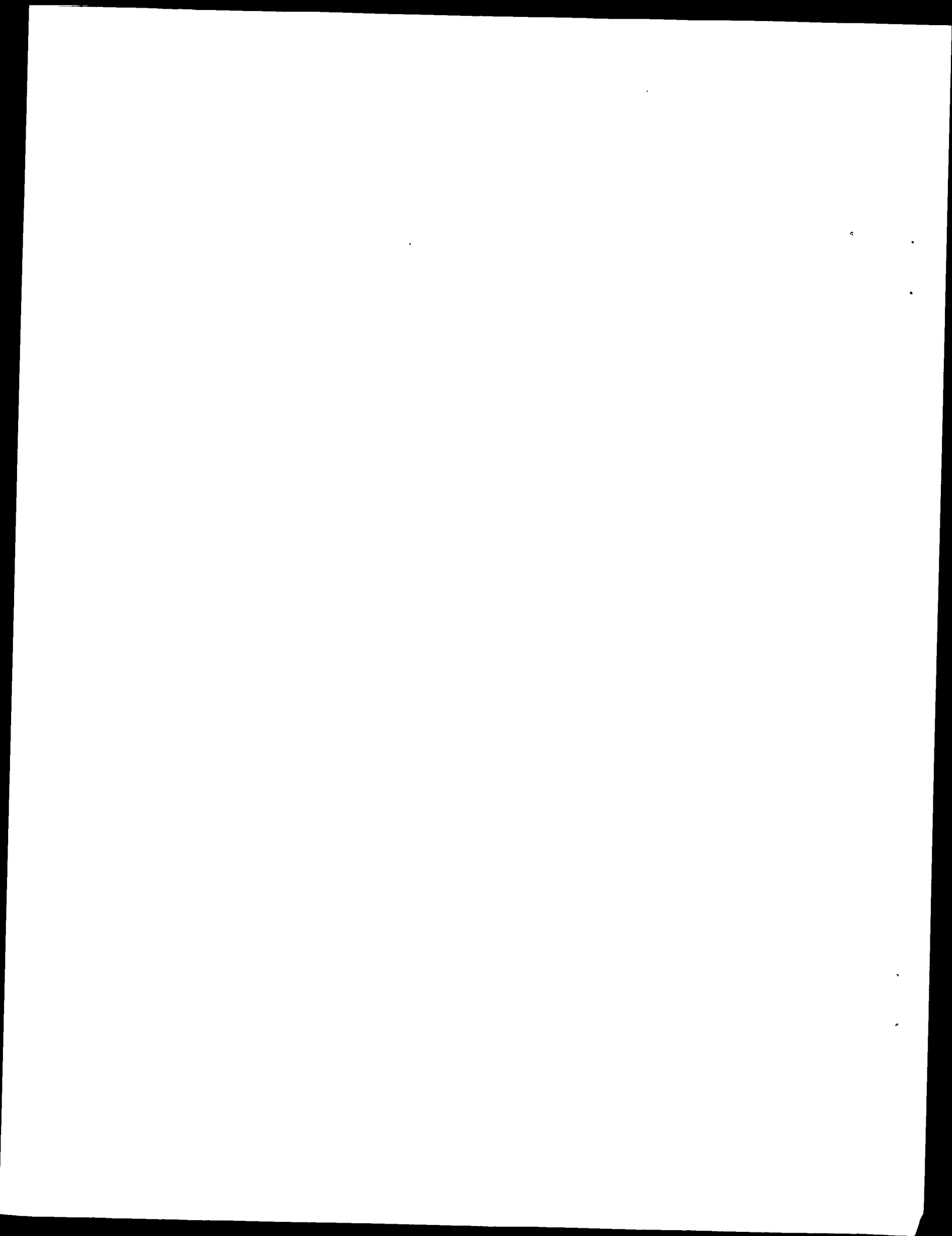
135

His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu Leu Ser

140

145

150



Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr His Arg  
 155 160 165 170  
 Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp  
 175 180 185  
 5 Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu Val Gly  
 190 195 200  
 Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr  
 205 210 215 220  
 Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln Val Arg  
 10 225 230 235

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1685

&lt;212&gt; DNA

15 &lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 3

ctcacatgta tctttcagaa taaatggaga ggatcttctg cttcaagtac aagtaagagc 60  
 tcggccagac tggtctctgg tatgccatga gggccggagc ccagccctgg gcatgcacat 120  
 20 ctgcaagagt cttgggcata tcaggcttac tcaacacaag gccgtgaatc tgtctgacat 180  
 caagctcaac agatcccagg agtttgctca actctctgct agaccgggag gcctttaga 240  
 ggaggc atg gaa gcc cag gta ggg ctt ctg tgg gtt agc gct aac tgt cct 291

Met Glu Ala Gln Val Gly Leu Leu Trp Val Ser Ala Asn Cys Pro

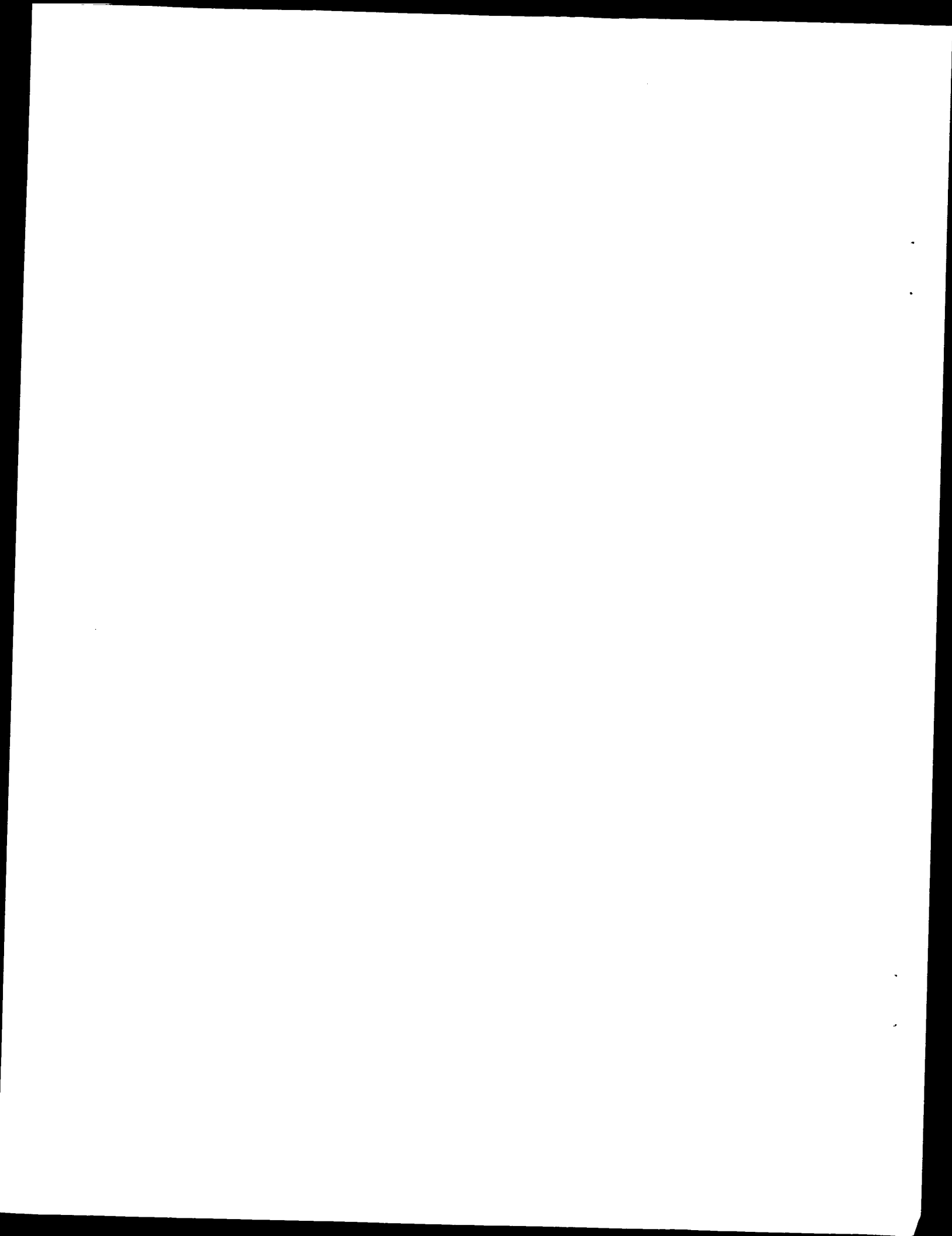
-35

-30

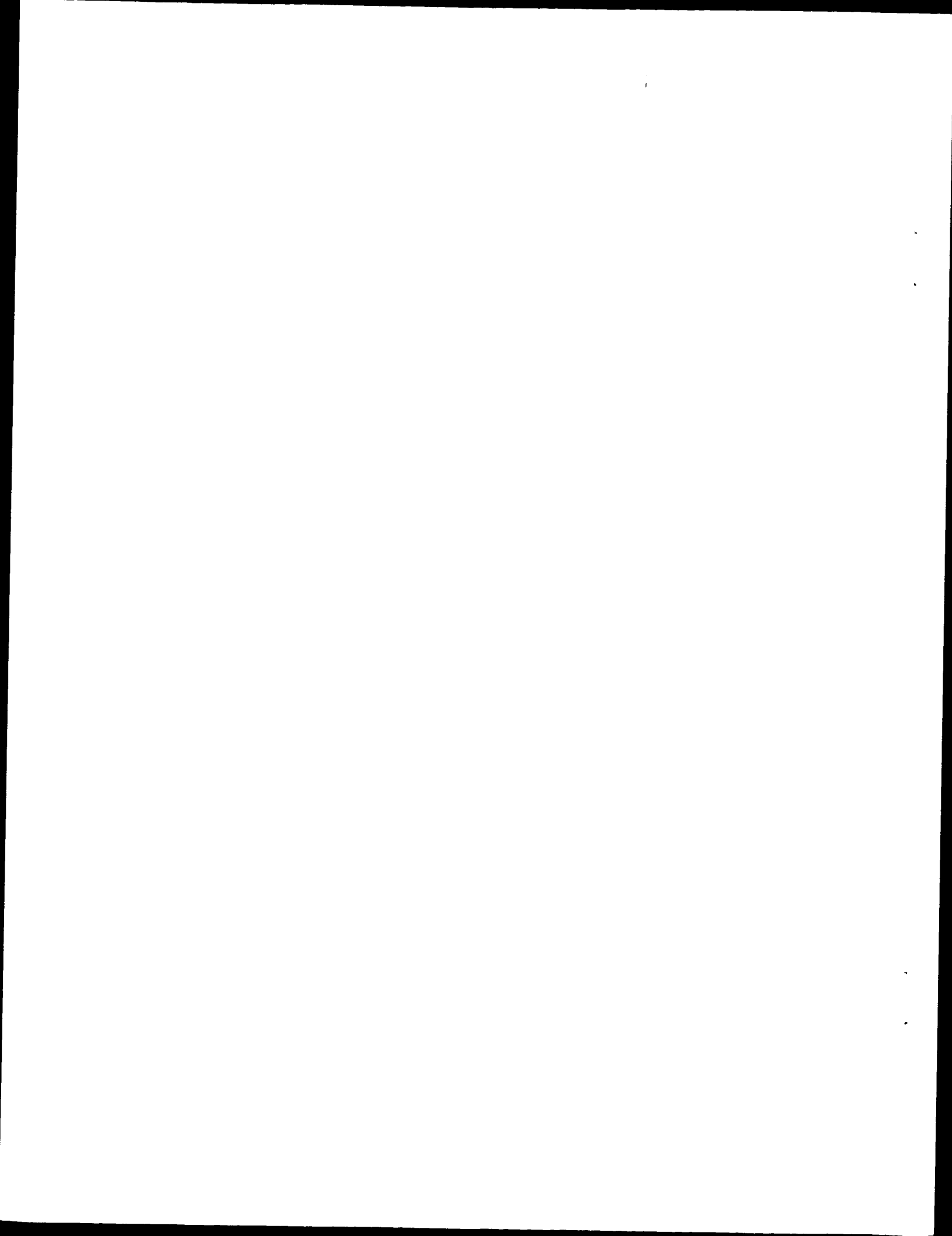
-25

25 tct ggc cga att gtt tct ctc aaa tgt tct gag tgt ggg gca agg cct ctg 342  
 Ser Gly Arg Ile Val Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu  
 -20 -15 -10 -5

gct tct cga ata gtt ggc ggc caa gct gtg gct tct ggg cgc tgg cca tgg 393  
 Ala Ser Arg Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp



	-1	1		5		10	
	caa gct agc gtg atg ctt ggc tcc cgg cac acg tgt ggg gcc tct gtg ttg	444					
	Gln Ala Ser Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu						
	15	20	25	30			
5	gca cca cac tgg gta gtg act gct gcc cac tgc atg tac agt ttc agg ctg	495					
	Ala Pro His Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu						
	35	40	45				
	tcc cgc cta tcc agc tgg cgg gtt cat gca ggg ctg gtc agc cat ggt gct	546					
	Ser Arg Leu Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala						
10	50	55	60	65			
	gtc cga caa cac cag gga act atg gtg gag aag atc att cct cat cct ttg	597					
	Val Arg Gln His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu						
	70	75	80				
	tac agt gcc cag aac cat gac tat gat gtg gct ctg ctg cag ctc cgg aca	648					
15	Tyr Ser Ala Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr						
	85	90	95				
	cca atc aac ttc tca gac acc gtg gac gct gtg tgc ttg ccg gcc aag gag	699					
	Pro Ile Asn Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu						
	100	105	110	115			
20	cag tac ttt cca tgg ggg tcg cag tgc tgg gtg tct ggc tgg ggc cac acc	750					
	Gln Tyr Phe Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr						
	120	125	130				
	gac ccc agc cat act cat agc tca gat aca ctg cag gac aca atg gta ccc	801					
	Asp Pro Ser His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro						
25	135	140	145	150			
	ctg ctc agc acc cac ctc tgc aac agc tca tgc atg tac agt ggg gca ctt	852					
	Leu Leu Ser Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu						
	155	160	165				
	aca cac cgc atg ttg tgt gct ggc tac ctg gat gga agg gca gac gca tgc	903					





Thr His Arg Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys

170

175

180

cag gga gac agc ggg gga ccc ctg gta tgt ccc agt ggt gac acg tgg cac 954

Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His

5

185

190

195

200

ctt gta ggg gtg gtc agc tgg ggt cgt ggc tgt gca gag ccc aat cgc cca 1005

Leu Val Gly Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro

205

210

215

ggt gtc tat gcc aag gta gca gag ttc ctg gac tgg atc cat gac act gtg 1056

10

Gly Val Tyr Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val

220

225

230

235

cag gtc cgc tagccgaaga agcagcagca gccacctgtg acgccgagct gtggatcgcc 1115

Gln Val Arg

15

catggatcac cccagtctgg gggccagcat ctgggtcact gggcctctcc ccaaaggctc 1175

tgacttcgag ttcattcttc tcacttgaga acctccacaa caggaaaagg agtctgcggc 1235

tagattggga atgatggtga gaggaaggga taggaggaca gaagagacag cagaggcttc 1295

tggaagcatc tgggagactg ctctctgtct cccccacac cccacgtgca tccactgggg 1355

gatgctggag atgccaatc cttgtttctt gtggggccac tggaaggcta agtccaactt 1415

20

tagaggatgc cctgtctcga gagttactag gcagataagg ttaagggttg acaagctcag 1475

gtaaaggcac ggaagtcaag atccccctct ccccgctcgg tcctgttctg aggtaagcta 1535

atagccccgc accaggcaga ggtctacagg gtaagaagga tgcagttggg ctacacgacg 1595

ctatTTTTTca aatgatgttt ctgtaaattg gttgagagag ttttgttatt aaacagaaat 1655

tatgtataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1685

25

<210> 4

<211> 273

<212> PRT

<213> mouse



&lt;400&gt; 4

	Met	Glu	Ala	Gln	Val	Gly	Leu	Leu	Trp	Val	Ser	Ala	Asn	Cys	Pro
	-35					-30								-25	
5	Ser	Gly	Arg	Ile	Val	Ser	Leu	Lys	Cys	Ser	Glu	Cys	Gly	Ala	Arg
	-20					-15					-10				-5
	Ala	Ser	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Arg	Trp
		-1	1				5						10		
	Gln	Ala	Ser	Val	Met	Leu	Gly	Ser	Arg	His	Thr	Cys	Gly	Ala	Ser
10	15					20					25				30
	Ala	Pro	His	Trp	Val	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Met	Tyr	Ser	Phe
						35					40				45
	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Trp	Arg	Val	His	Ala	Gly	Leu	Val	Ser	His
		50					55					60			65
15	Val	Arg	Gln	His	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Glu	Lys	Ile	Ile	Pro	His
						70					75				80
	Tyr	Ser	Ala	Gln	Asn	His	Asp	Tyr	Asp	Val	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu
			85					90						95	
	Pro	Ile	Asn	Phe	Ser	Asp	Thr	Val	Asp	Ala	Val	Cys	Leu	Pro	Ala
20	100					105					110				115
	Gln	Tyr	Phe	Pro	Trp	Gly	Ser	Gln	Cys	Trp	Val	Ser	Gly	Trp	Gly
						120					125				130
	Asp	Pro	Ser	His	Thr	His	Ser	Ser	Asp	Thr	Leu	Gln	Asp	Thr	Met
		135						140					145		150
25	Leu	Leu	Ser	Thr	His	Leu	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Tyr	Ser	Gly
						155					160				165
	Thr	His	Arg	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Tyr	Leu	Asp	Gly	Arg	Ala	Asp
						170					175				180
	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Asp	Thr



8/35

185                      190                      195                      200  
 Leu Val Gly Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro  
                          205                      210                      215  
 Gly Val Tyr Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val  
 5                      220                      225                      230                      235  
 Gln Val Arg

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2068

10 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 5

15 ctggctgggc tgttgaatca atcccgacat gaggacagga gcctcaccct gcccagcaga 60  
 acttactgcc ttatatcagt gcagctgact catatgagtc caacactgga tgaccaaagc 120  
 ccaatggaga ttcggtgcac ggaagagggt gctgggcctg ggatcttcag aatggagttg 180  
 ggagaccaga ggcaatccat ttctcagtcc caacgctggt gctgcctgca acgtggctgt 240  
 gtaatactgg gcgtcctggg gctgctggct ggagcaggca ttgcttcatg gctcttagtg 300  
 ttgtatctat ggccggctgc ctctccatcc atctctggga cgttgcagga ggaggagatg 360  
 20 actttgaact gtccaggagt gagctgtgag gaagagctcc ttccatctct tcccaaaaca 420  
 gaataaatgg aggggatctt ctgcttcaag tacaagtaag agctcggcca gactggctcc 480  
 tggctcgcga tgagggtctg agccccgccc tgggc atg cac atc tgc aag agt ctt 536

Met His Ile Cys Lys Ser Leu

-70

25 ggg cat atc agg ctt act caa cac aag gcc gtg aat ctg tct gac atc aag 587  
 Gly His Ile Arg Leu Thr Gln His Lys Ala Val Asn Leu Ser Asp Ile Lys

-65

-60

-55

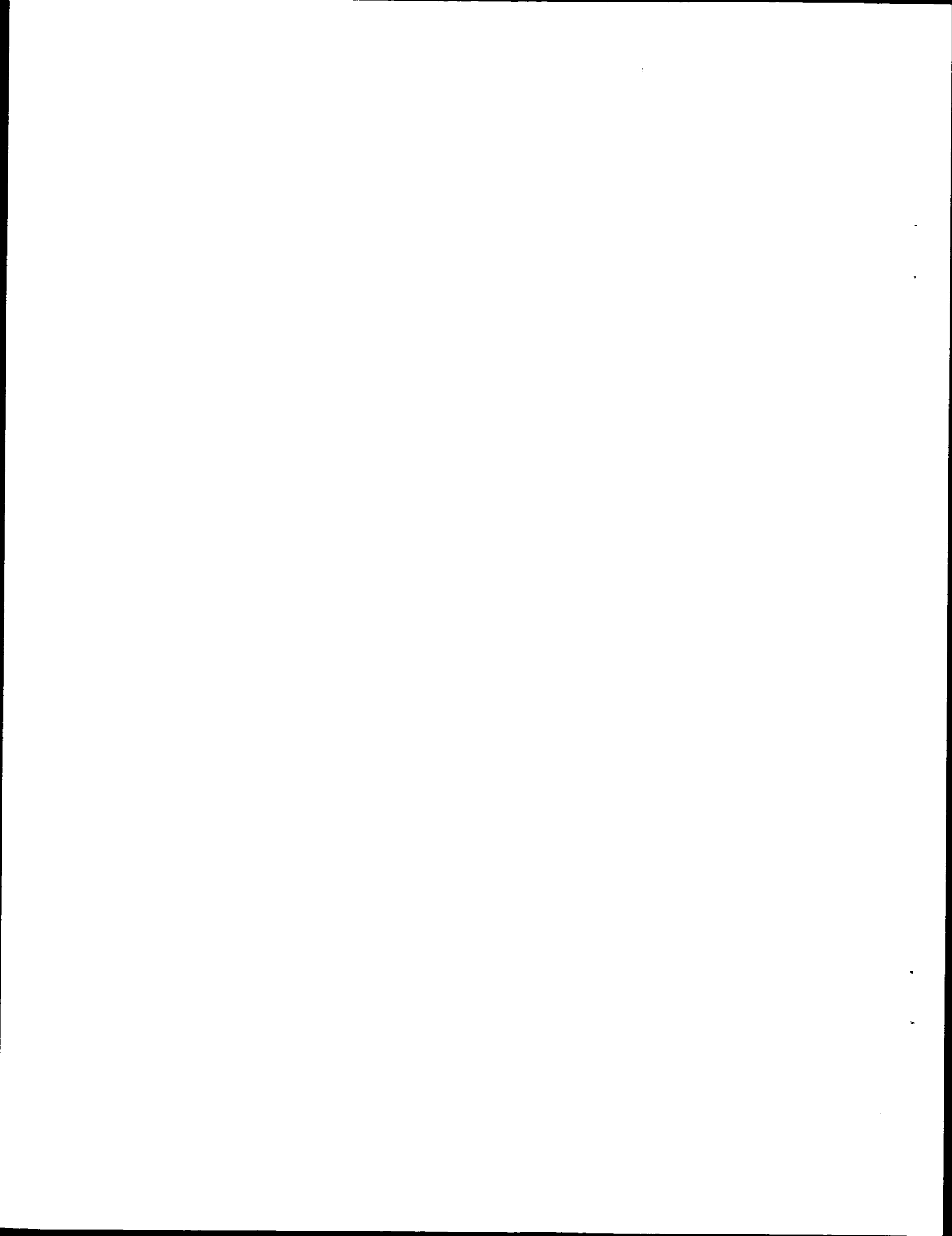
-50

ctc aac aga tcc cag gag ttt gct caa ctc tct gct aga ccg gga ggc ctt 638  
 Leu Asn Arg Ser Gln Glu Phe Ala Gln Leu Ser Ala Arg Pro Gly Gly Leu



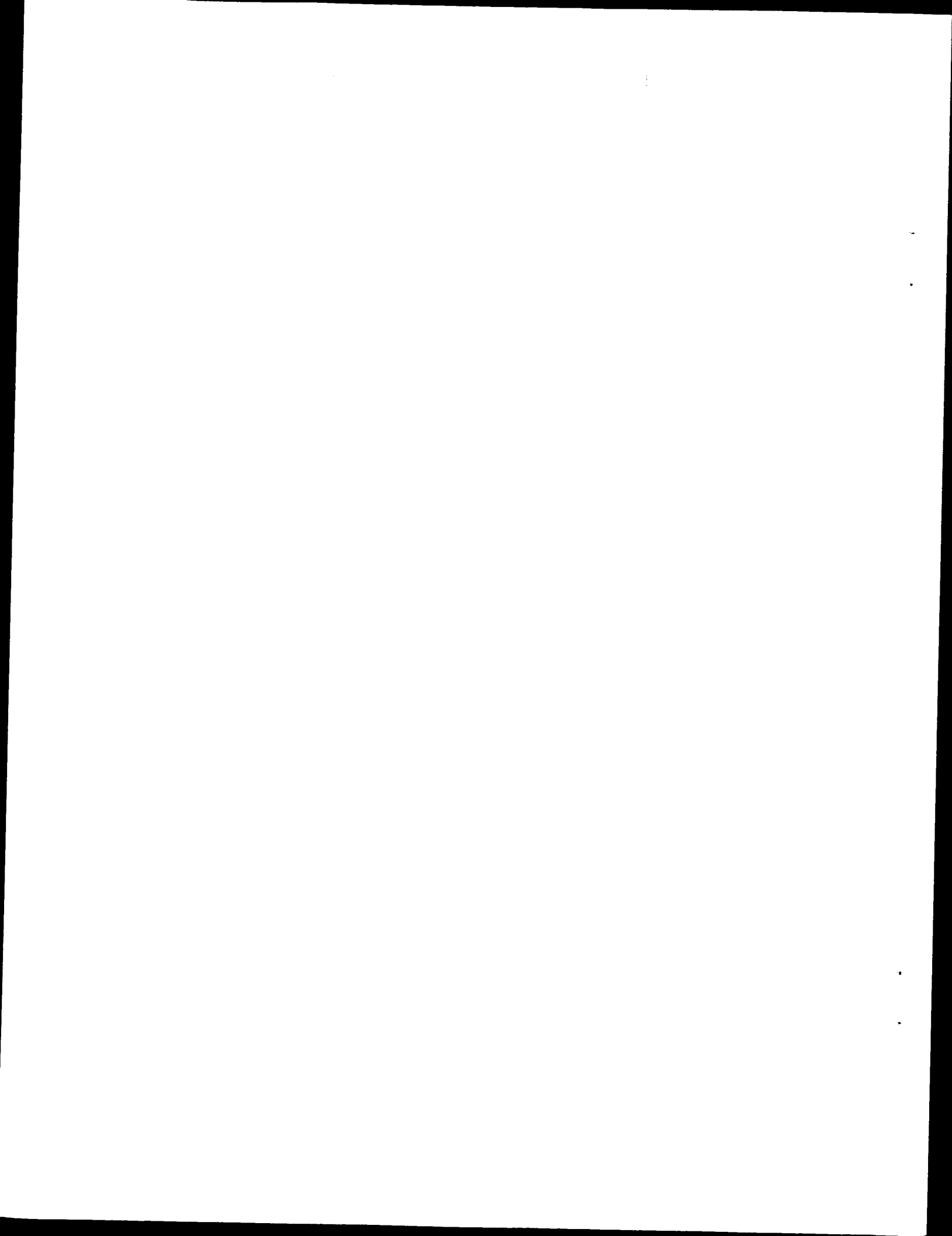
9/35

	-45	-40	-35	
	gta gag gag gca tgg aag ccc agc gct aac tgt cct tct ggc cga att gtt 689			
	Val Glu Glu Ala Trp Lys Pro Ser Ala Asn Cys Pro Ser Gly Arg Ile Val			
	-30	-25	-20	
5	tct ctc aaa tgt tct gag tgt ggg gca agg cct ctg gct tct cga ata gtt 740			
	Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu Ala Ser Arg Ile Val			
	-15	-10	-5	-1 1
	ggc ggc caa gct gtg gct tct ggg cgc tgg cca tgg caa gct agc gtg atg 791			
	Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser Val Met			
10	5	10	15	
	ctt ggc tcc cgg cac acg tgt ggg gcc tct gtg ttg gca cca cac tgg gta 842			
	Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala Pro His Trp Val			
	20	25	30	35
	gtg act gct gcc cac tgc atg tac agt ttc agg ctg tcc cgc cta tcc agc 893			
15	Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser Arg Leu Ser Ser			
	40	45	50	
	tgg cgg gtt cat gca ggg ctg gtc agc cat ggt gct gtc cga caa cac cag 944			
	Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val Arg Gln His Gln			
	55	60	65	70
20	gga act atg gtg gag aag atc att cct cat cct ttg tac agt gcc cag aac 995			
	Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala Gln Asn			
	75	80	85	
	cat gac tat gat gtg gct ctg ctg cag ctc cgg aca cca atc aac ttc tca 1046			
	His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro Ile Asn Phe Ser			
25	90	95	100	
	gac acc gtg gac gct gtg tgc ttg ccg gcc aag gag cag tac ttt cca tgg 1097			
	Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln Tyr Phe Pro Trp			
	105	110	115	120
	ggg tcg cag tgc tgg gtg tct ggc tgg ggc cac acc gac ccc agc cat act 1148			





Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp Pro Ser His Thr  
 125 130 135  
 cat agc tca gat aca ctg cag gac aca atg gta ccc ctg ctc agc acc cac 1199  
 His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu Leu Ser Thr His  
 5 140 145 150 155  
 ctc tgc aac agc tca tgc atg tac agt ggg gca ctt aca cac cgc atg ttg 1250  
 Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr His Arg Met Leu  
 160 165 170  
 tgt gct ggc tac ctg gat gga agg gca gac gca tgc cag gga gac agc ggg 1301  
 10 Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly  
 175 180 185  
 gga ccc ctg gta tgt ccc agt ggt gac acg tgg cac ctt gta ggg gtg gtc 1352  
 Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu Val Gly Val Val  
 190 195 200 205  
 15 agc tgg ggt cgt ggc tgt gca gag ccc aat cgc cca ggt gtc tat gcc aag 1403  
 Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ala Lys  
 210 215 220  
 gta gca gag ttc ctg gac tgg atc cat gac act gtg cag gtc cgc tagccga 1455  
 Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln Val Arg  
 20 225 230 235  
 agaagcagca gcagccacct gtgacgccga gctgtggatc gcccatggat caccaccagtc 1515  
 tgggggccag catctgggtc actgggcctc tccccaaagg ctctgacttc gagttcatct 1575  
 ttctcatctg agaacctcca caacaggaaa aggagtctgc ggctagattg ggaatgatgg 1635  
 tgagaggaag ggataggagg acagaagaga cagcagaggc ttctggaagc atctgggaga 1695  
 25 ctgctcctct gctcccccca caccaccagt gcatccactg ggggatgctg gagatgccca 1755  
 atccttgttt cttgtggggc cactggaagg ctaagtccaa ctttagagga tgccctgtct 1815  
 cgagagttac taggcagata aggttaaggt tggacaagct caggtaaagg cacggaagtc 1875  
 aagatccct ctcctccgtg cggctcctgtt ctgaggtaag ctaatagccc cgcaccaggc 1935  
 agaggcttac agggtaagaa ggatgcagtt gggctacacg acgctatctt tcaaatgatg 1995



tttctgtaaa ttggttgaga gagttttggt attaaacaga aattatgtat aaaaaaaaaa 2055  
 aaaaaaaaaa aaa 2068

<210> 6

5 <211> 311

<212> PRT

<213> mouse

<400> 6

10

Met His Ile Cys Lys Ser Leu

-70

Gly His Ile Arg Leu Thr Gln His Lys Ala Val Asn Leu Ser Asp Ile Lys

-65

-60

-55

-50

Leu Asn Arg Ser Gln Glu Phe Ala Gln Leu Ser Ala Arg Pro Gly Gly Leu

15

-45

-40

-35

Val Glu Glu Ala Trp Lys Pro Ser Ala Asn Cys Pro Ser Gly Arg Ile Val

-30

-25

-20

Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu Ala Ser Arg Ile Val

-15

-10

-5

-1 1

20

Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser Val Met

5

10

15

Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala Pro His Trp Val

20

25

30

35

Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser Arg Leu Ser Ser

25

40

45

50

Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val Arg Gln His Gln

55

60

65

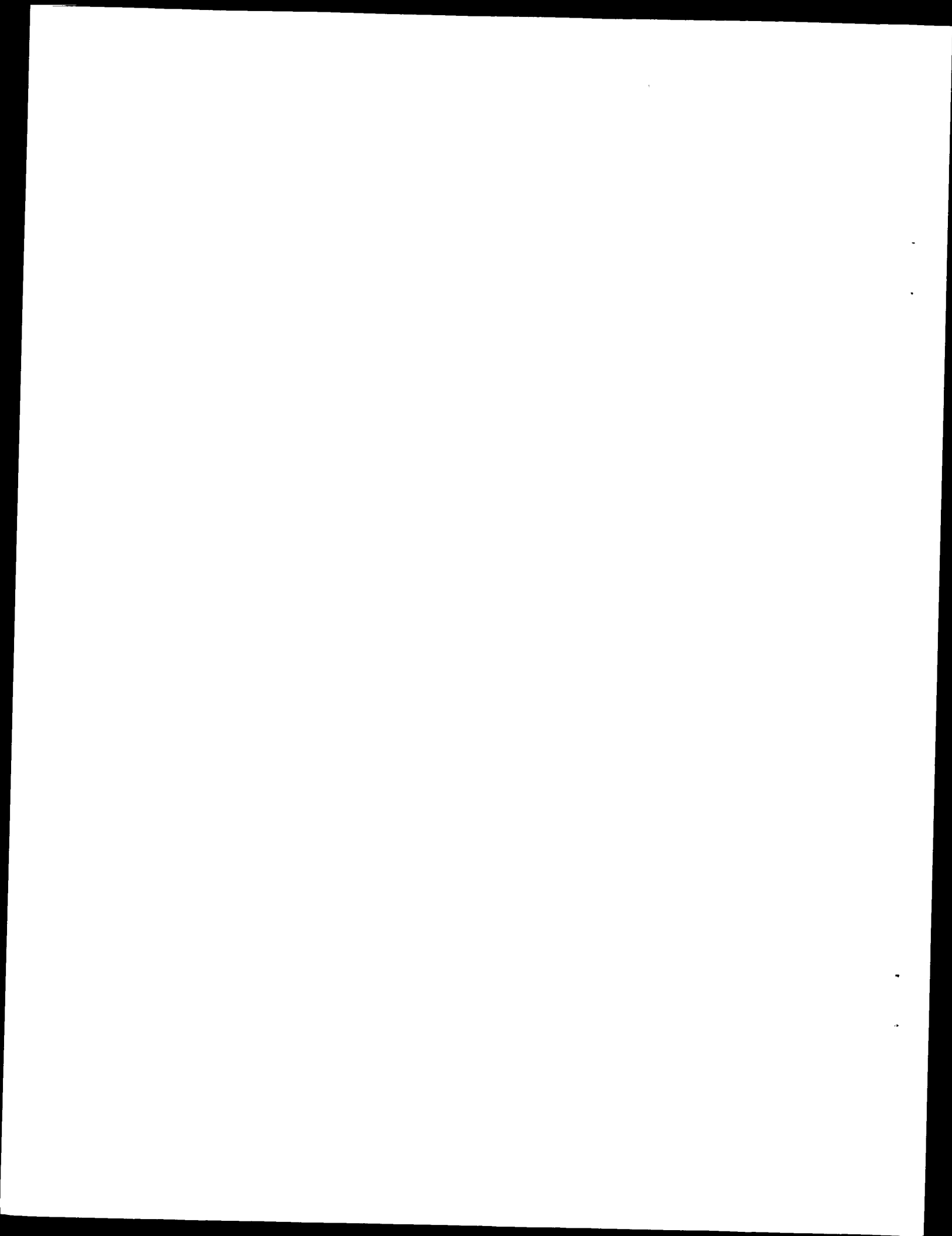
70

Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala Gln Asn

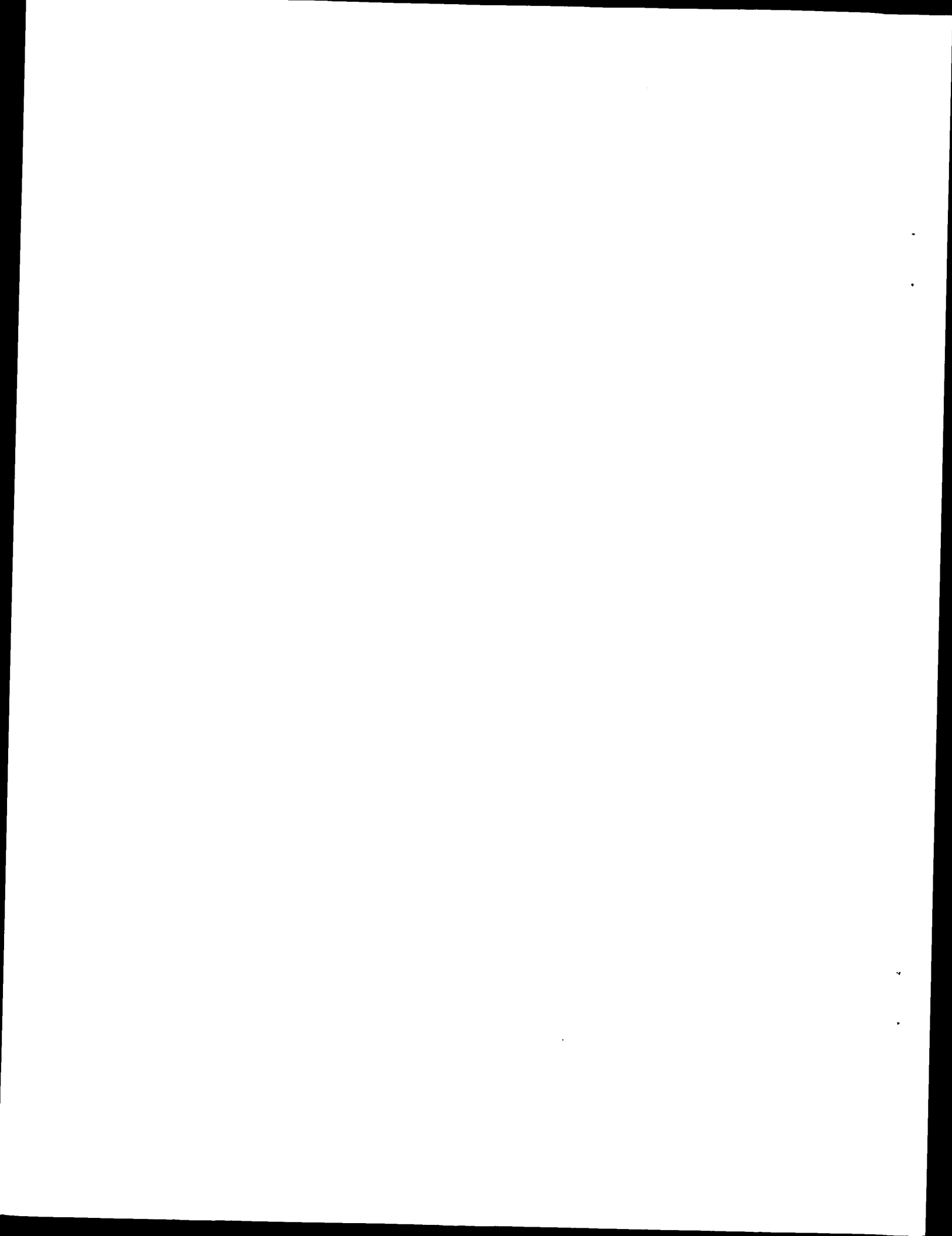
75

80

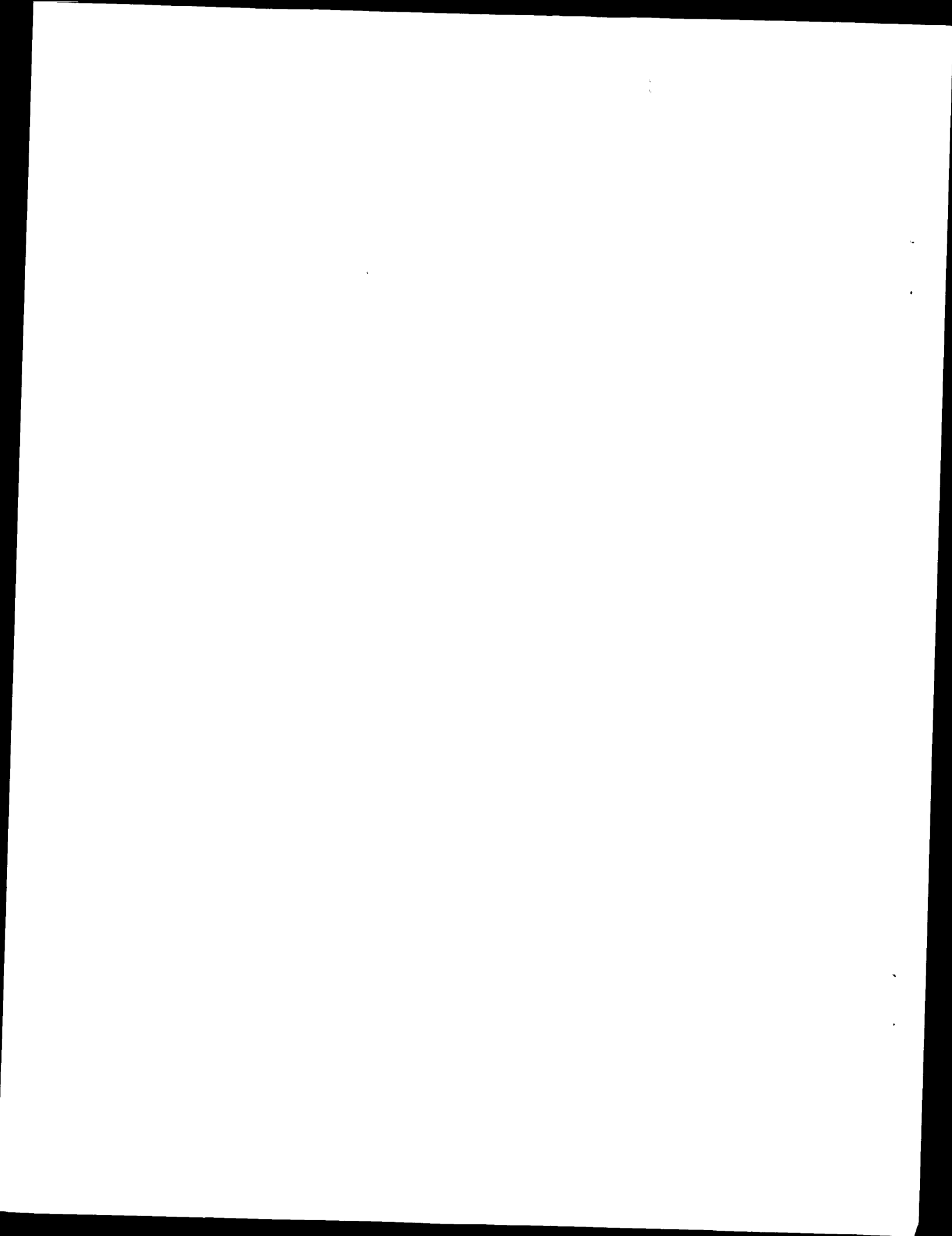
85







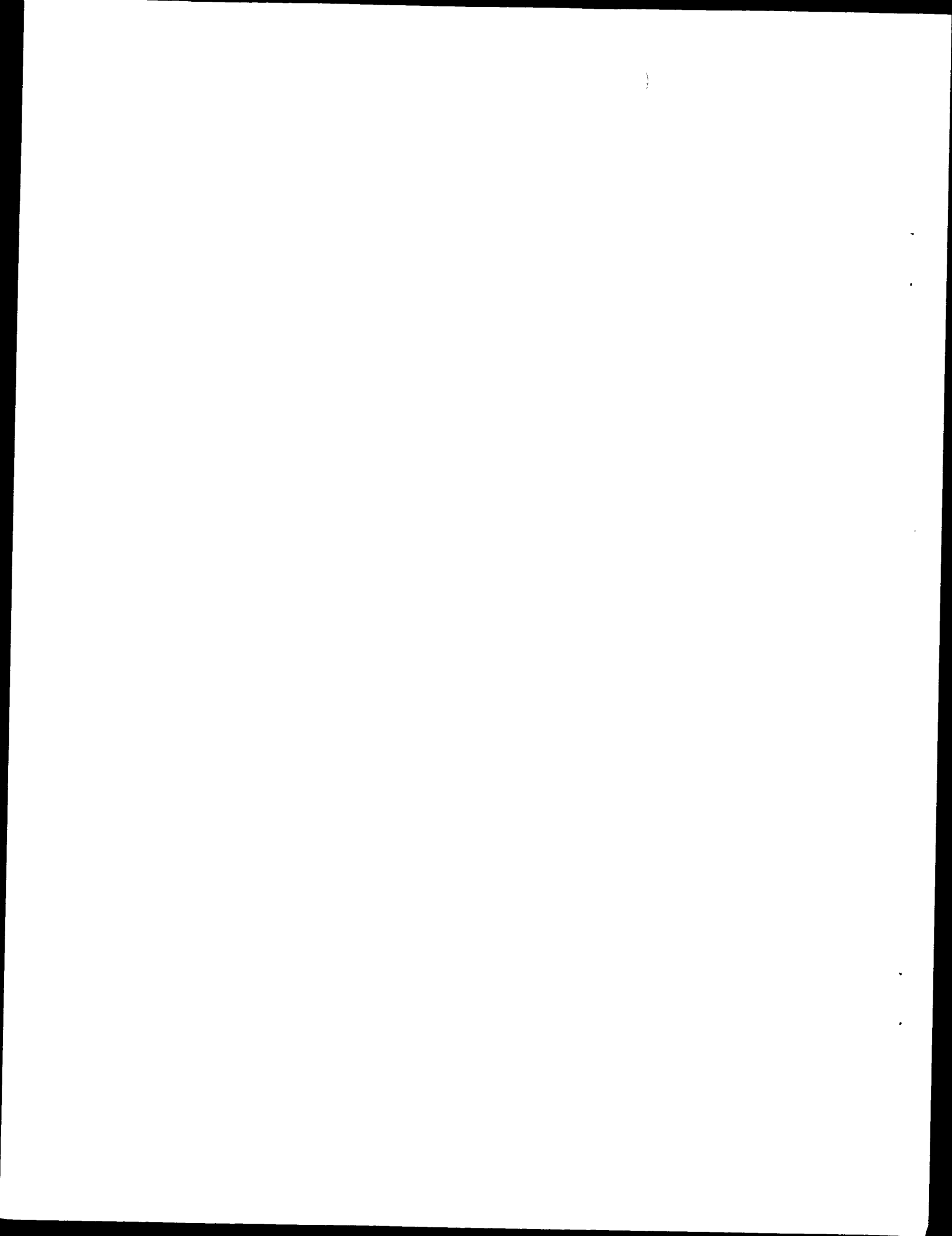
gag att cgg tgc acg gaa gag ggt gct ggg cct ggg atc ttc aga atg gag 169  
 Glu Ile Arg Cys Thr Glu Glu Gly Ala Gly Pro Gly Ile Phe Arg Met Glu  
 -205 -200 -195 -190  
 ttg gga gac cag agg caa tcc att tct cag tcc caa cgc tgg tgc tgc ctg 220  
 5 Leu Gly Asp Gln Arg Gln Ser Ile Ser Gln Ser Gln Arg Trp Cys Cys Leu  
 -185 -180 -175  
 caa cgt ggc tgt gta ata ctg ggc gtc ctg ggg ctg ctg gct gga gca ggc 271  
 Gln Arg Gly Cys Val Ile Leu Gly Val Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ala Gly  
 -170 -165 -160  
 att gct tca tgg ctc tta gtg ttg tat cta tgg cca gct gcc tct cca tcc 322  
 10 Ile Ala Ser Trp Leu Leu Val Leu Tyr Leu Trp Pro Ala Ala Ser Pro Ser  
 -155 -150 -145 -140  
 atc tct ggg acg ttg cag gag gag gag atg act ttg aac tgt cca gga gtg 373  
 Ile Ser Gly Thr Leu Gln Glu Glu Glu Met Thr Leu Asn Cys Pro Gly Val  
 15 -135 -130 -125  
 agc tgt gag gaa gag ctc ctt cca tct ctt ccc aaa aca gta tct ttc aga 424  
 Ser Cys Glu Glu Glu Leu Leu Pro Ser Leu Pro Lys Thr Val Ser Phe Arg  
 -120 -115 -110 -105  
 ata aat gga gag gat ctt ctg ctt caa gta caa gta aga gct cgg cca gac 475  
 20 Ile Asn Gly Glu Asp Leu Leu Leu Gln Val Gln Val Arg Ala Arg Pro Asp  
 -100 -95 -90  
 tgg ctc ctg gtc tgc cat gag ggc tgg agc ccc gcc ctg ggc atg cac atc 526  
 Trp Leu Leu Val Cys His Glu Gly Trp Ser Pro Ala Leu Gly Met His Ile  
 -85 -80 -75  
 tgc aag agt ctt ggg cat atc agg ctt act caa cac aag gcc gtg aat ctg 577  
 25 Cys Lys Ser Leu Gly His Ile Arg Leu Thr Gln His Lys Ala Val Asn Leu  
 -70 -65 -60 -55  
 tct gac atc aag ctc aac aga tcc cag gag ttt gct caa ctc tct gct aga 628  
 Ser Asp Ile Lys Leu Asn Arg Ser Gln Glu Phe Ala Gln Leu Ser Ala Arg



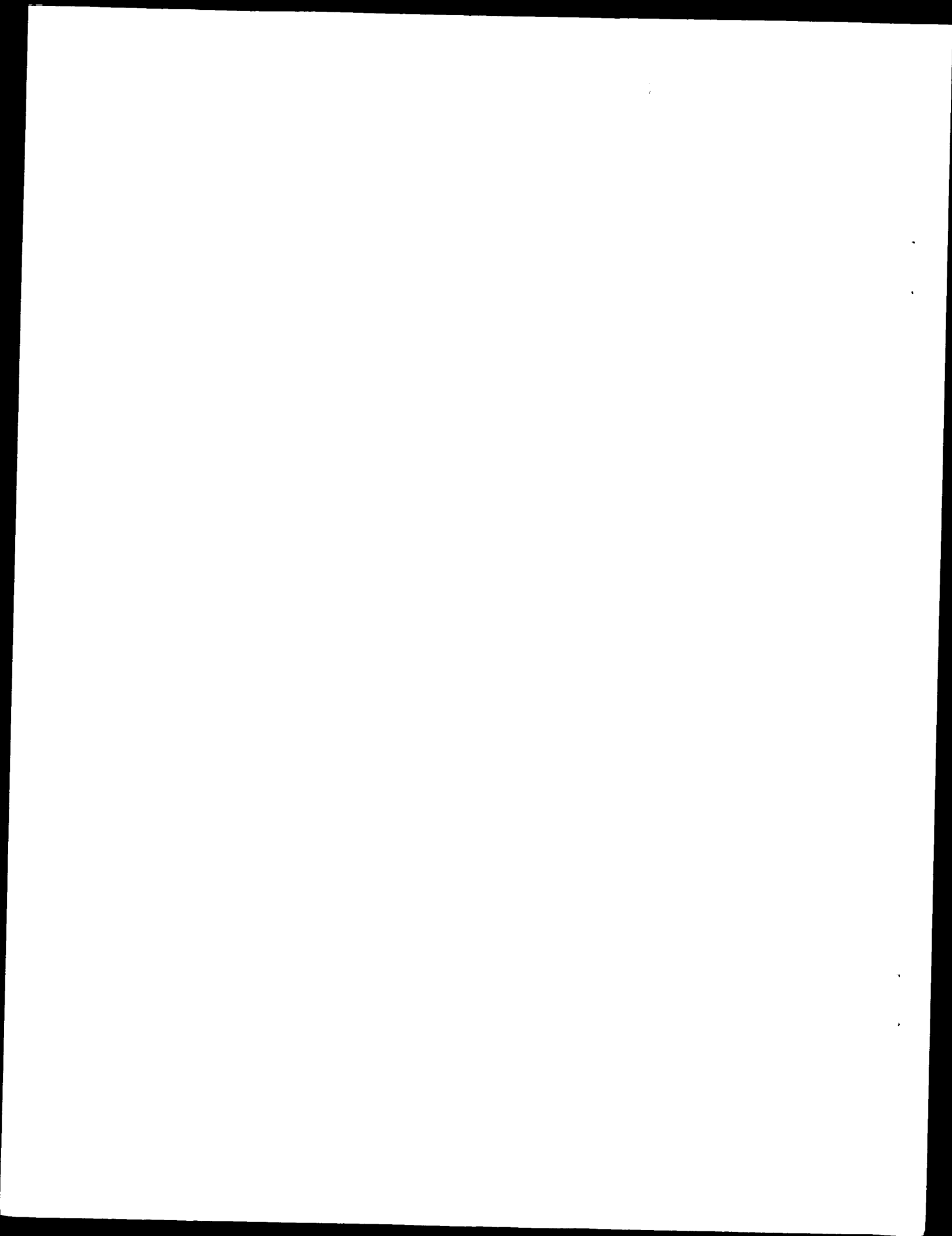


14/35

	-50	-45	-40	
	ccg gga ggc ctt gta gag gag gca tgg aag ccc agc gct aac tgt cct tct	679		
	Pro Gly Gly Leu Val Glu Glu Ala Trp Lys Pro Ser Ala Asn Cys Pro Ser			
	-35	-30	-25	-20
5	ggc cga att gtt tct ctc aaa tgt tct gag tgt ggg gca agg cct ctg gct	730		
	Gly Arg Ile Val Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu Ala			
	-15	-10	-5	
	tct cga ata gtt ggc ggc caa gct gtg gct tct ggg cgc tgg cca tgg caa	781		
	Ser Arg Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln			
10	-1 1 5 10 15			
	gct agc gtg atg ctt ggc tcc cgg cac acg tgt ggg gcc tct gtg ttg gca	832		
	Ala Ser Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala			
	20 25 30			
	cca cac tgg gta gtg act gct gcc cac tgc atg tac agt ttc agg ctg tcc	883		
15	Pro His Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser			
	35 40 45			
	cgc cta tcc agc tgg cgg gtt cat gca ggg ctg gtc agc cat ggt gct gtc	934		
	Arg Leu Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val			
	50 55 60 65			
20	cga caa cac cag gga act atg gtg gag aag atc att cct cat cct ttg tac	985		
	Arg Gln His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr			
	70 75 80			
	agt gcc cag aac cat gac tat gat gtg gct ctg ctg cag ctc cgg aca cca	1036		
	Ser Ala Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro			
25	85 90 95 100			
	atc aac ttc tca gac acc gtg gac gct gtg tgc ttg ccg gcc aag gag cag	1087		
	Ile Asn Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln			
	105 110 115			
	tac ttt cca tgg ggg tcg cag tgc tgg gtg tct ggc tgg ggc cac acc gac	1138		



Tyr Phe Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp  
 120 125 130  
 ccc agc cat act cat agc tca gat aca ctg cag gac aca atg gta ccc ctg 1189  
 Pro Ser His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu  
 5 135 140 145 150  
 ctc agc acc cac ctc tgc aac agc tca tgc atg tac agt ggg gca ctt aca 1240  
 Leu Ser Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr  
 155 160 165  
 cac cgc atg ttg tgt gct ggc tac ctg gat gga agg gca gac gca tgc cag 1291  
 10 His Arg Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln  
 170 175 180 185  
 gga gac agc ggg gga ccc ctg gta tgt ccc agt ggt gac acg tgg cac ctt 1342  
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu  
 190 195 200  
 15 gta ggg gtg gtc agc tgg ggt cgt ggc tgt gca gag ccc aat cgc cca ggt 1393  
 Val Gly Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly  
 205 210 215  
 gtc tat gcc aag gta gca gag ttc ctg gac tgg atc cat gac act gtg cag 1444  
 Val Tyr Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln  
 20 220 225 230 235  
 gtc cgc tagccgaaga agcagcagca gccacctgtg acgccgagct gtggatcgcc 1500  
 Val Arg  
 catggatcac cccagtctgg gggccagcat ctgggtcact gggcctctcc ccaaaggctc 1560  
 25 tgacttcgag ttcattcttc tcatctgaga acctccacaa caggaaaagg agtctgcggc 1620  
 tagattggga atgatggtga gaggaaggga taggaggaca gaagagacag cagaggcttc 1680  
 tggaagcatc tgggagactg ctccctctgct cccccacac cccacgtgca tccactgggg 1740  
 gatgctggag atgcccaatc cttgtttctt gtggggccac tggaaggcta agtccaactt 1800  
 tagaggatgc cctgtctcga gagttactag gcagataagg ttaaggttgg acaagctcag 1860



gtaaaggcac ggaagtcaag atccccctctc ccccggtgcgg tcctgttctg aggtaagcta 1920  
 atagccccgc accaggcaga ggtctacagg gtaagaagga tgcagttggg ctacacgacg 1980  
 ctatTTTTca aatgatgttt ctgtaaattg gttgagagag ttttgttatt aaacagaaat 2040  
 tatgtataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2070

5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 445

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

10

&lt;400&gt; 8

Met

15

Glu Ile Arg Cys Thr Glu Glu Gly Ala Gly Pro Gly Ile Phe Arg Met Glu  
 -205 -200 -195 -190

Leu Gly Asp Gln Arg Gln Ser Ile Ser Gln Ser Gln Arg Trp Cys Cys Leu  
 -185 -180 -175

Gln Arg Gly Cys Val Ile Leu Gly Val Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ala Gly  
 -170 -165 -160

20

Ile Ala Ser Trp Leu Leu Val Leu Tyr Leu Trp Pro Ala Ala Ser Pro Ser  
 -155 -150 -145 -140

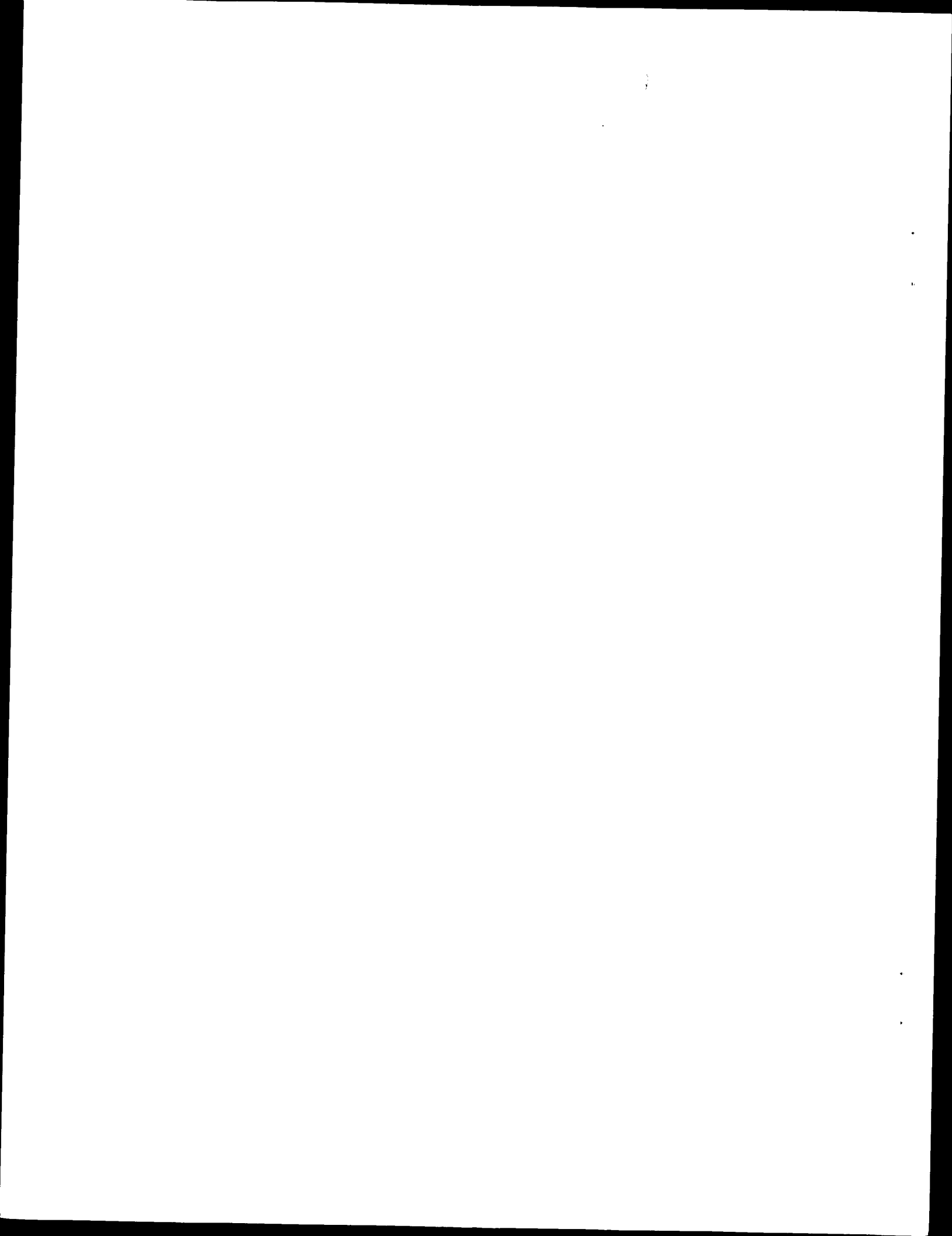
Ile Ser Gly Thr Leu Gln Glu Glu Glu Met Thr Leu Asn Cys Pro Gly Val  
 -135 -130 -125

25

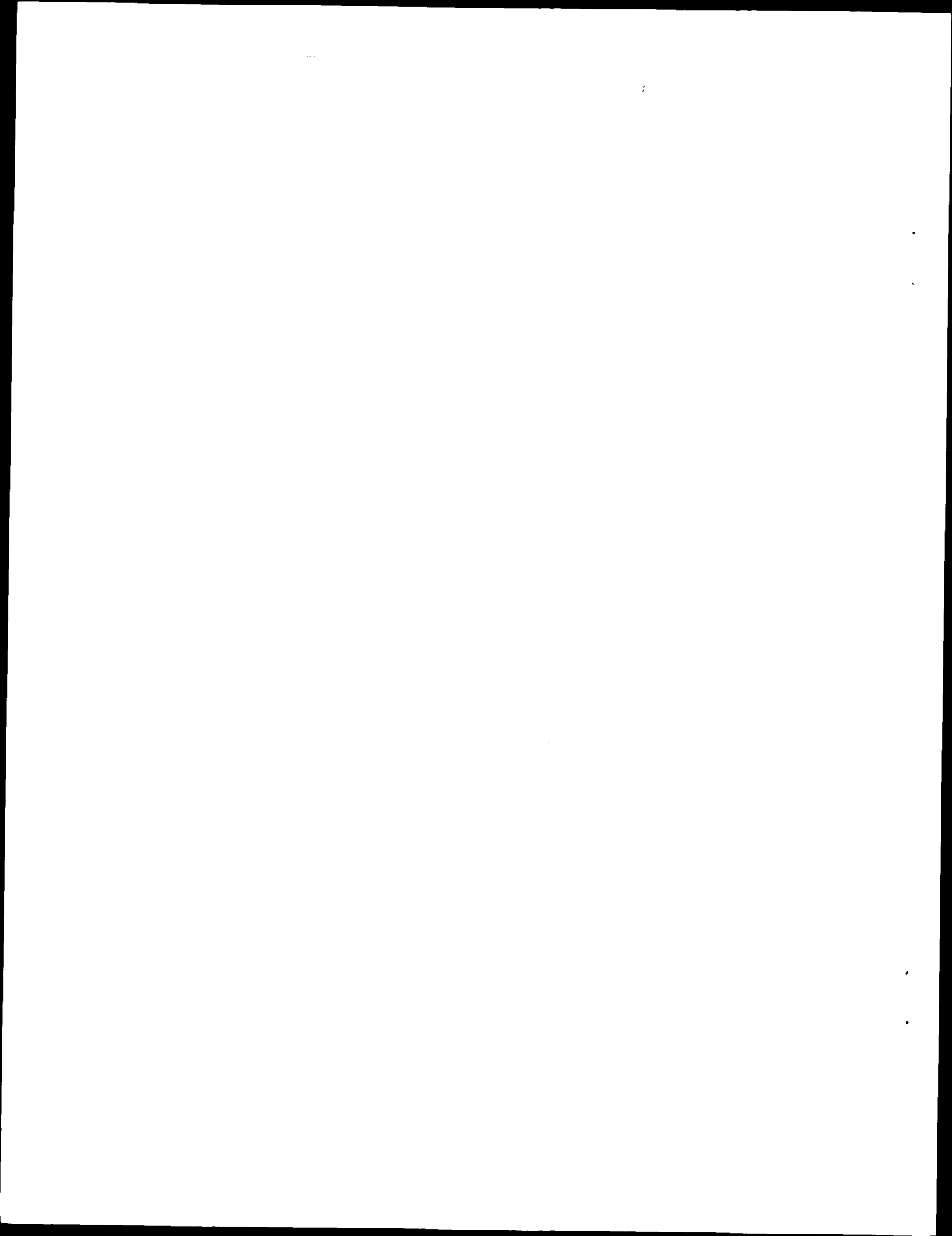
Ser Cys Glu Glu Glu Leu Leu Pro Ser Leu Pro Lys Thr Val Ser Phe Arg  
 -120 -115 -110 -105

Ile Asn Gly Glu Asp Leu Leu Leu Gln Val Gln Val Arg Ala Arg Pro Asp  
 -100 -95 -90

Trp Leu Leu Val Cys His Glu Gly Trp Ser Pro Ala Leu Gly Met His Ile  
 -85 -80 -75

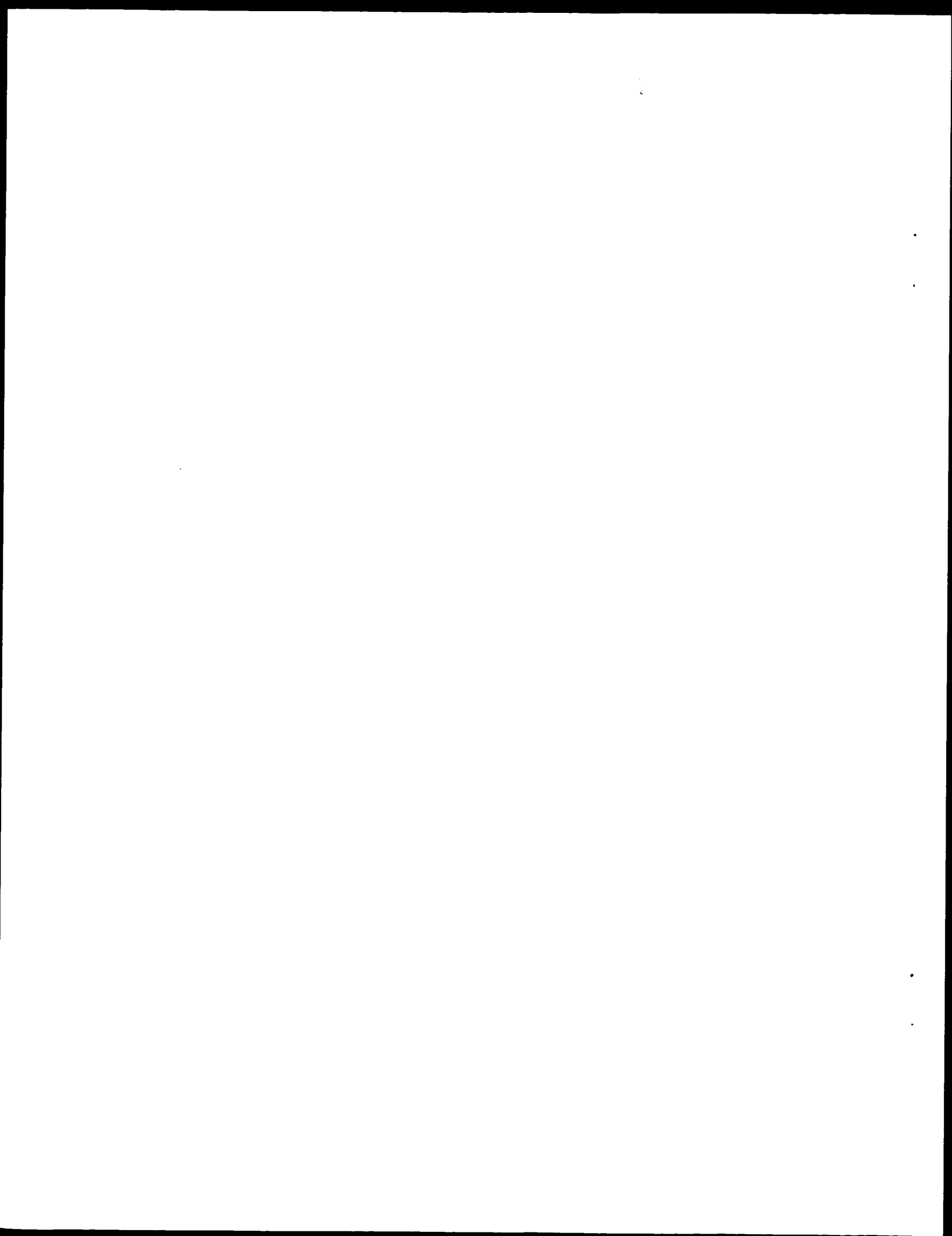


Cys Lys Ser Leu Gly His Ile Arg Leu Thr Gln His Lys Ala Val Asn Leu  
 -70 -65 -60 -55  
 Ser Asp Ile Lys Leu Asn Arg Ser Gln Glu Phe Ala Gln Leu Ser Ala Arg  
 -50 -45 -40  
 5 Pro Gly Gly Leu Val Glu Glu Ala Trp Lys Pro Ser Ala Asn Cys Pro Ser  
 -35 -30 -25 -20  
 Gly Arg Ile Val Ser Leu Lys Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu Ala  
 -15 -10 -5  
 Ser Arg Ile Val Gly Gly Gln Ala Val Ala Ser Gly Arg Trp Pro Trp Gln  
 10 -1 1 5 10 15  
 Ala Ser Val Met Leu Gly Ser Arg His Thr Cys Gly Ala Ser Val Leu Ala  
 20 25 30  
 Pro His Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Met Tyr Ser Phe Arg Leu Ser  
 35 40 45  
 15 Arg Leu Ser Ser Trp Arg Val His Ala Gly Leu Val Ser His Gly Ala Val  
 50 55 60 65  
 Arg Gln His Gln Gly Thr Met Val Glu Lys Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr  
 70 75 80  
 Ser Ala Gln Asn His Asp Tyr Asp Val Ala Leu Leu Gln Leu Arg Thr Pro  
 20 85 90 95 100  
 Ile Asn Phe Ser Asp Thr Val Asp Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln  
 105 110 115  
 Tyr Phe Pro Trp Gly Ser Gln Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr Asp  
 120 125 130  
 25 Pro Ser His Thr His Ser Ser Asp Thr Leu Gln Asp Thr Met Val Pro Leu  
 135 140 145 150  
 Leu Ser Thr His Leu Cys Asn Ser Ser Cys Met Tyr Ser Gly Ala Leu Thr  
 155 160 165  
 His Arg Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln

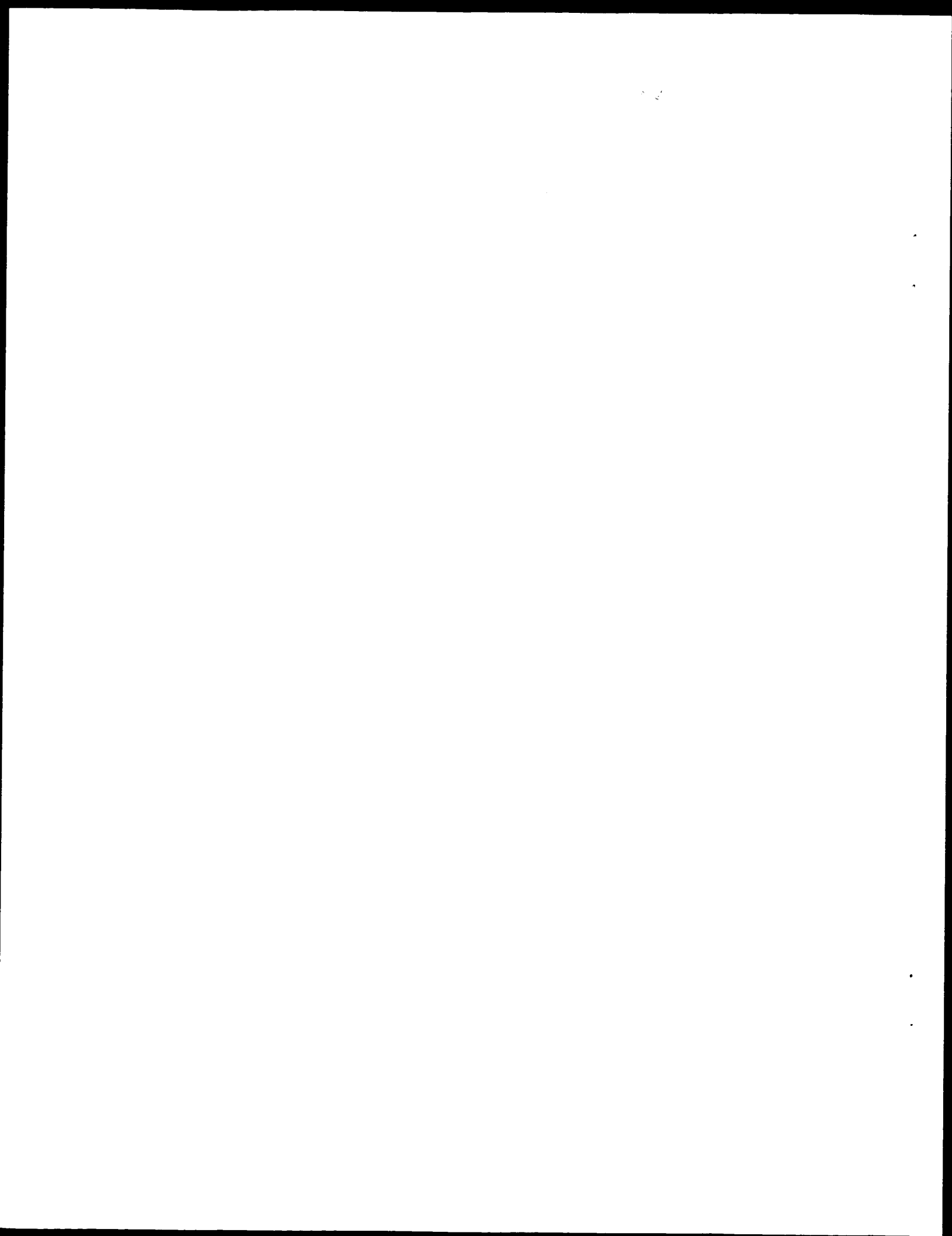




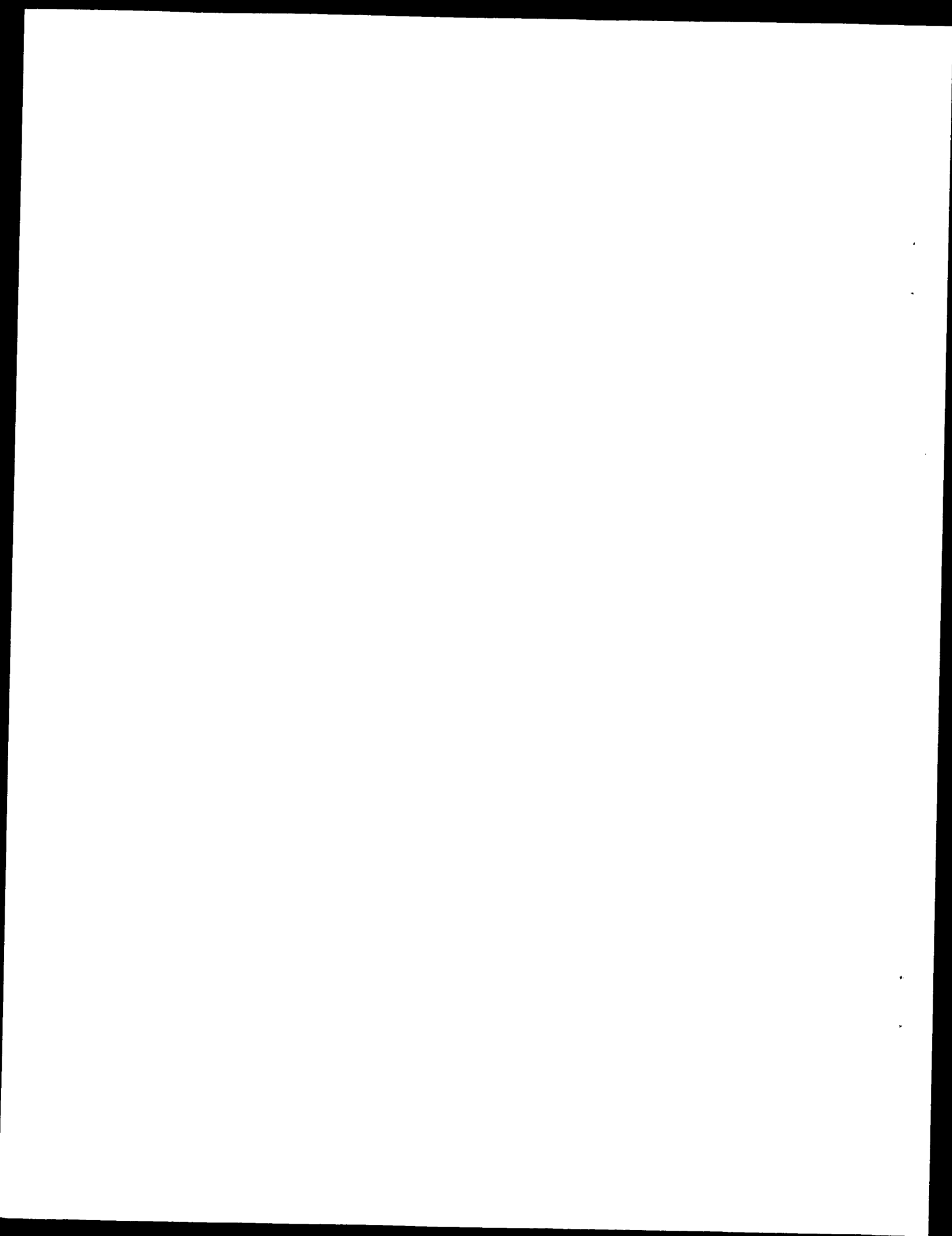
	170	175	180	185
	Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Pro Ser Gly Asp Thr Trp His Leu			
		190	195	200
	Val Gly Val Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Glu Pro Asn Arg Pro Gly			
5	205	210	215	
	Val Tyr Ala Lys Val Ala Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Val Gln			
	220	225	230	235
	Val Arg			
10	<210> 9			
	<211> 2265			
	<212> DNA			
	<213> human			
15	<400> 9			
	acgcgggata cagggagggg ccatgtgcga accagggaga cctcatcttc caaccaagct			60
	tgctgggctt gcatttaatc aatgcatggc cagagaacag gagcggaaca ttgcctagta			120
	gaccctgagg ctttacaaca gtgctactga ccct			155
	atg agc ctg atg ctg gat gac caa ccc cct atg gag gcc cag tat gca gag			206
20	Met Ser Leu Met Leu Asp Asp Gln Pro Pro Met Glu Ala Gln Tyr Ala Glu			
	-215	-210	-205	
	gag ggc cca gga cct ggg atc ttc aga gca gag cct gga gac cag cag cat			257
	Glu Gly Pro Gly Pro Gly Ile Phe Arg Ala Glu Pro Gly Asp Gln Gln His			
	-200	-195	-190	-185
25	ccc att tct cag gcg gtg tgc tgg cgt tcc atg cga cgt ggc tgt gca gtg			308
	Pro Ile Ser Gln Ala Val Cys Trp Arg Ser Met Arg Arg Gly Cys Ala Val			
	-180	-175	-170	
	ctg gga gcc ctg ggg ctg ctg gcc ggt gca ggt gtt ggc tca tgg ctc cta			359
	Leu Gly Ala Leu Gly Leu Leu Ala Gly Ala Gly Val Gly Ser Trp Leu Leu			



	-165	-160	-155	-150	
	gtg ctg tat ctg tgt cct gct gcc tct cag ccc att tcc ggg acc ttg cag	410			
	Val Leu Tyr Leu Cys Pro Ala Ala Ser Gln Pro Ile Ser Gly Thr Leu Gln				
	-145	-140	-135		
5	gat gag gag ata act ttg agc tgc tca gag gcc agc gct gag gaa gct ctg	461			
	Asp Glu Glu Ile Thr Leu Ser Cys Ser Glu Ala Ser Ala Glu Glu Ala Leu				
	-130	-125	-120		
	ctc cct gca ctc ccc aaa aca gta tct ttc aga ata aac agc gaa gac ttc	512			
	Leu Pro Ala Leu Pro Lys Thr Val Ser Phe Arg Ile Asn Ser Glu Asp Phe				
10	-115	-110	-105	-100	
	ttg ctg gaa gcg caa gtg agg gat cag cca cgc tgg ctc ctg gtc tgc cat	563			
	Leu Leu Glu Ala Gln Val Arg Asp Gln Pro Arg Trp Leu Leu Val Cys His				
	-95	-90	-85		
	gag ggc tgg agc ccc gcc ctg ggg ctg cag atc tgc tgg agc ctt ggg cat	614			
15	Glu Gly Trp Ser Pro Ala Leu Gly Leu Gln Ile Cys Trp Ser Leu Gly His				
	-80	-75	-70	-65	
	ctc aga ctc act cac cac aag gga gta aac ctc act gac atc aaa ctc aac	665			
	Leu Arg Leu Thr His His Lys Gly Val Asn Leu Thr Asp Ile Lys Leu Asn				
	-60	-55	-50		
20	agt tcc cag gag ttt gct cag ctc tct cct aga ctg gga ggc ttc ctg gag	716			
	Ser Ser Gln Glu Phe Ala Gln Leu Ser Pro Arg Leu Gly Gly Phe Leu Glu				
	-45	-40	-35		
	gag gcg tgg cag ccc agg aac aac tgc act tct ggt caa gtt gtt tcc ctc	767			
	Glu Ala Trp Gln Pro Arg Asn Asn Cys Thr Ser Gly Gln Val Val Ser Leu				
25	-30	-25	-20	-15	
	aga tgc tct gag tgt gga gcg agg ccc ctg gct tcc cgg ata gtt ggt ggg	818			
	Arg Cys Ser Glu Cys Gly Ala Arg Pro Leu Ala Ser Arg Ile Val Gly Gly				
	-10	-5	-1	1	
	cag tct gtg gct cct ggg cgc tgg ccg tgg cag gcc agc gtg gcc ctg ggc	869			



Gln Ser Val Ala Pro Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser Val Ala Leu Gly  
 5                      10                      15                      20  
 ttc cgg cac acg tgt ggg ggc tct gtg cta gcg cca cgc tgg gtg gtg act 920  
 Phe Arg His Thr Cys Gly Gly Ser Val Leu Ala Pro Arg Trp Val Val Thr  
 5                      25                      30                      35  
 gct gca cat tgt atg cac agt ttc agg ctg gcc cgc ctg tcc agc tgg cgg 971  
 Ala Ala His Cys Met His Ser Phe Arg Leu Ala Arg Leu Ser Ser Trp Arg  
 40                      45                      50                      55  
 gtt cat gcg ggg ctg gtc agc cac agt gcc gtc agg ccc cac caa ggg gct 1022  
 10 Val His Ala Gly Leu Val Ser His Ser Ala Val Arg Pro His Gln Gly Ala  
 60                      65                      70  
 ctg gtg gag agg att atc cca cac ccc ctc tac agt gcc cag aat cat gac 1073  
 Leu Val Glu Arg Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala Gln Asn His Asp  
 75                      80                      85  
 15 tac gac gtc gcc ctc ctg agg ctc cag acc gct ctc aac ttc tca gac act 1124  
 Tyr Asp Val Ala Leu Leu Arg Leu Gln Thr Ala Leu Asn Phe Ser Asp Thr  
 90                      95                      100                      105  
 gtg ggc gct gtg tgc ctg ccg gcc aag gaa cag cat ttt ccg aag ggc tcg 1175  
 Val Gly Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln His Phe Pro Lys Gly Ser  
 20                      110                      115                      120  
 cgg tgc tgg gtg tct ggc tgg ggc cac acc cac cct agc cat act tac agc 1226  
 Arg Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr His Pro Ser His Thr Tyr Ser  
 125                      130                      135                      140  
 tcg gat atg ctc cag gac acg gtg gtg ccc ttg ttc agc act cag ctc tgc 1277  
 25 Ser Asp Met Leu Gln Asp Thr Val Val Pro Leu Phe Ser Thr Gln Leu Cys  
 145                      150                      155  
 aac agc tct tgc gtg tac agc gga gcc ctc acc ccc cgc atg ctt tgc gct 1328  
 Asn Ser Ser Cys Val Tyr Ser Gly Ala Leu Thr Pro Arg Met Leu Cys Ala  
 160                      165                      170



21/35

ggc tac ctg gac gga agg gct gat gca tgc cag gga gat agc ggg ggc ccc 1379  
 Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 175 180 185 190  
 cta gtg tgc cca gat ggg gac aca tgg cgc cta gtg ggg gtg gtc agc tgg 1430  
 5 Leu Val Cys Pro Asp Gly Asp Thr Trp Arg Leu Val Gly Val Val Ser Trp  
 195 200 205  
 ggg cgt gcg tgc gca gag ccc aat cac cca ggt gtc tac gcc aag gta gct 1481  
 Gly Arg Ala Cys Ala Glu Pro Asn His Pro Gly Val Tyr Ala Lys Val Ala  
 210 215 220 225  
 10 gag ttt ctg gac tgg atc cat gac act gct cag gac tcc ctc ctc 1526  
 Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Ala Gln Asp Ser Leu Leu  
 230 235 240  
 tgagtctgc tgtttcctcc agtctcactg cacaccactg cctcatgctt cctggggcct 1586  
 ccagcagctc cactaatgga ggagaggcag tagcctccga cacagaacgc atggacctcc 1646  
 15 tactactgtg tgtgaggaac agtcactacc cactggccag ccaccagcc aacaggtctc 1706  
 tcctcttggg ccttgatttc agagtcctct ttctcactag agactcaatg acagaagaga 1766  
 ggctgggact tggttgggca tgctgtggtt gctgagggat gagggggagg agagaggtag 1826  
 gagctggaga tgaagagact gctagaagca gcaggaagcc tgcccttctg ccctctcccc 1886  
 tccctgcccc tgtgtgagtc ttttagggag ggtgactggg aggtgcccc cgteccacct 1946  
 20 ttttctgtg ctctaggtgg gctaagtgcc tccctagagg actccatggc tgagaggctc 2006  
 ctgggcagat ggggtcaagg ctgggccagt cccagatgaa gcctatggga gtcaggacct 2066  
 tctccactct ccctctccac tccccttcct gttctcacct ggctgtggct ggccctgtgt 2126  
 ggggtgggta cactggaaaa caagaagggt ggagttggtc taggacattg gttttaaatg 2186  
 acagttctgt gaactgggtc aaggagggtc tgttattaaa gtgatatatg gtcttgaaaa 2246  
 25 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2265

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 457

&lt;212&gt; PRT



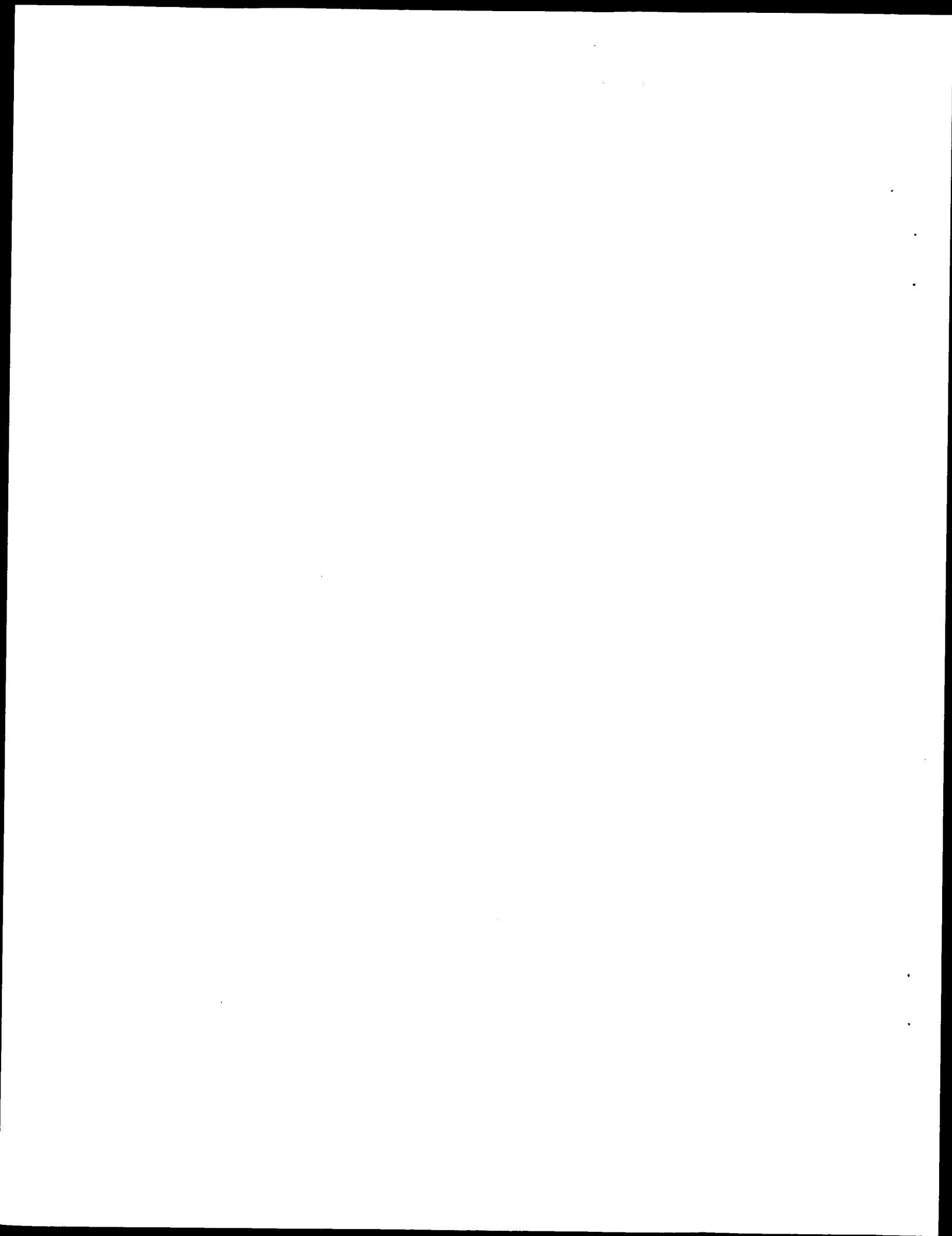






23/35

Gln Ser Val Ala Pro Gly Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ser Val Ala Leu Gly  
 5 10 15 20  
 Phe Arg His Thr Cys Gly Gly Ser Val Leu Ala Pro Arg Trp Val Val Thr  
 25 30 35  
 5 Ala Ala His Cys Met His Ser Phe Arg Leu Ala Arg Leu Ser Ser Trp Arg  
 40 45 50 55  
 Val His Ala Gly Leu Val Ser His Ser Ala Val Arg Pro His Gln Gly Ala  
 60 65 70  
 Leu Val Glu Arg Ile Ile Pro His Pro Leu Tyr Ser Ala Gln Asn His Asp  
 10 75 80 85  
 Tyr Asp Val Ala Leu Leu Arg Leu Gln Thr Ala Leu Asn Phe Ser Asp Thr  
 90 95 100 105  
 Val Gly Ala Val Cys Leu Pro Ala Lys Glu Gln His Phe Pro Lys Gly Ser  
 110 115 120  
 15 Arg Cys Trp Val Ser Gly Trp Gly His Thr His Pro Ser His Thr Tyr Ser  
 125 130 135 140  
 Ser Asp Met Leu Gln Asp Thr Val Val Pro Leu Phe Ser Thr Gln Leu Cys  
 145 150 155  
 Asn Ser Ser Cys Val Tyr Ser Gly Ala Leu Thr Pro Arg Met Leu Cys Ala  
 20 160 165 170  
 Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Ala Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 175 180 185 190  
 Leu Val Cys Pro Asp Gly Asp Thr Trp Arg Leu Val Gly Val Val Ser Trp  
 195 200 205  
 25 Gly Arg Ala Cys Ala Glu Pro Asn His Pro Gly Val Tyr Ala Lys Val Ala  
 210 215 220 225  
 Glu Phe Leu Asp Trp Ile His Asp Thr Ala Gln Asp Ser Leu Leu  
 230 235 240



<210> 11

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

<400> 11

10 aagcttggct agcaacacca tgaatctact cctgatcctt acctttgttg ctgctgctgt 60  
tgctgcccc tttgacgacg atgacaagga tccgaattc 99

<210> 12

<211> 99

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

<400> 12

20 gaattcggat ccttgtcatc gtcgtcaaag ggggcagcaa cagcagcagc aacaaaggta 66  
aggatcagga gtagattcat ggtgttgcta gccaaagctt 99

<210> 13

<211> 15

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding  
sequence

30



<400> 13

ttggtgcatg gcgga

15

<210> 14

5 <211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding  
sequence

<400> 14

tcctcgagac ttggcctgaa tggtttt

27

15 <210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin

<400> 15

gcgctagcag atctccatga atctactcct gatcc

35

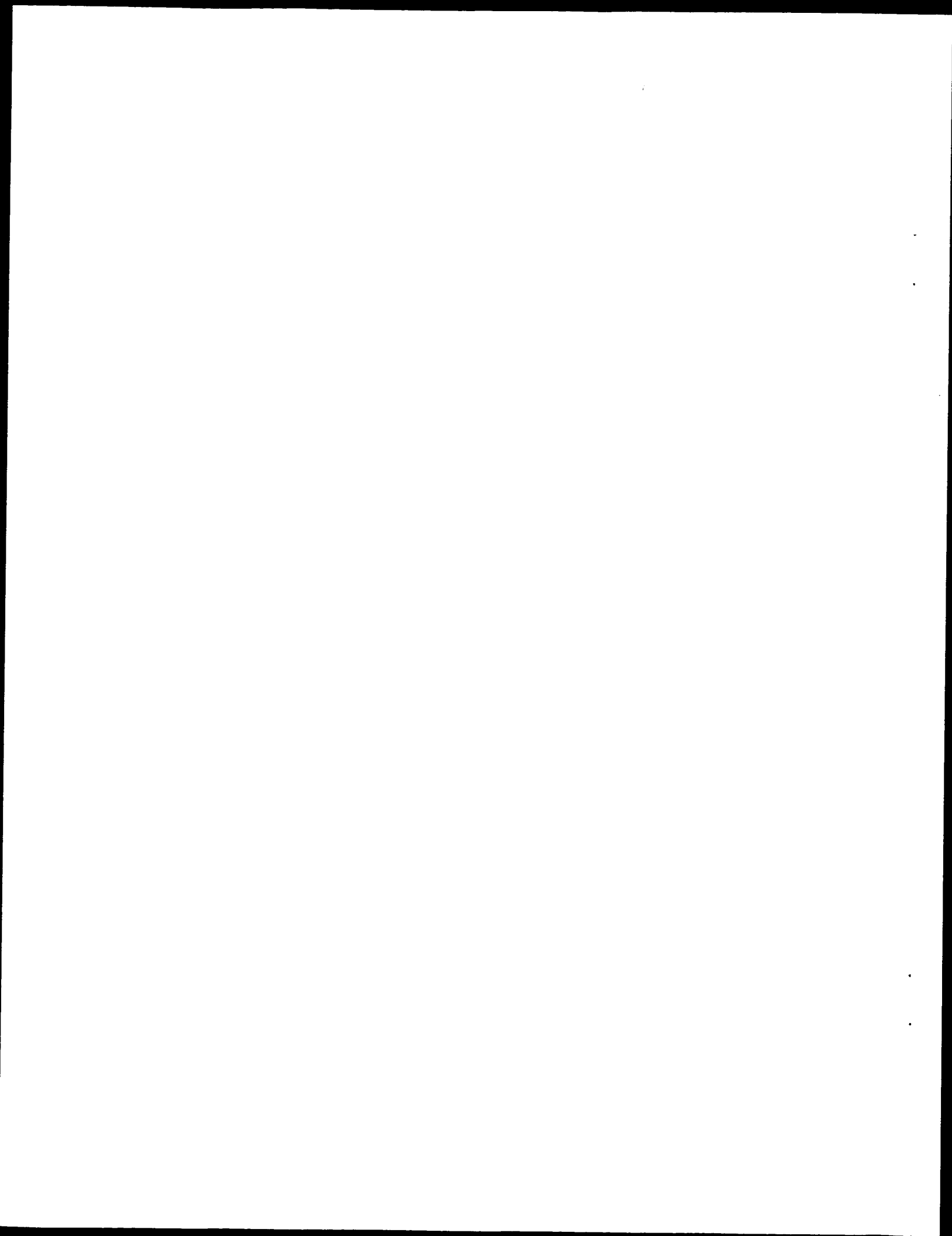
25

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence





<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin

5 <400> 16

tgaagcttgc catggaccaa cttgtcatc 29

<210> 17

<211> 26

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pTrypHis

15

<400> 17

ccaagcttca ccatcaccat caccat 26

<210> 18

20 <211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pTrypSigTag

25

<400> 18

gcacagtcga ggctgat 17



<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pFBTrypSigTag

<400> 19

10 caaatgtggt atggctg

17

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of  
serin proteases-encoding sequence

<220>

20 <221> UNSURE

<222> 9, 12

<223> n is a, c, g or t.

<400> 20

25 gtgctcacng cngcbcaytg

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of  
serin proteases-encoding sequence

5 <220>

<221> UNSURE

<222> 12, 15

<223> n is a, c, g or t.

10 <400> 21

ccvctrwsdc cncnggcca

20

<210> 22

<211> 21

15 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2.0 for RACE  
for mBSSP2 (forward)

20

<400> 22

atggtggaga agatcattcc t

21

<210> 23

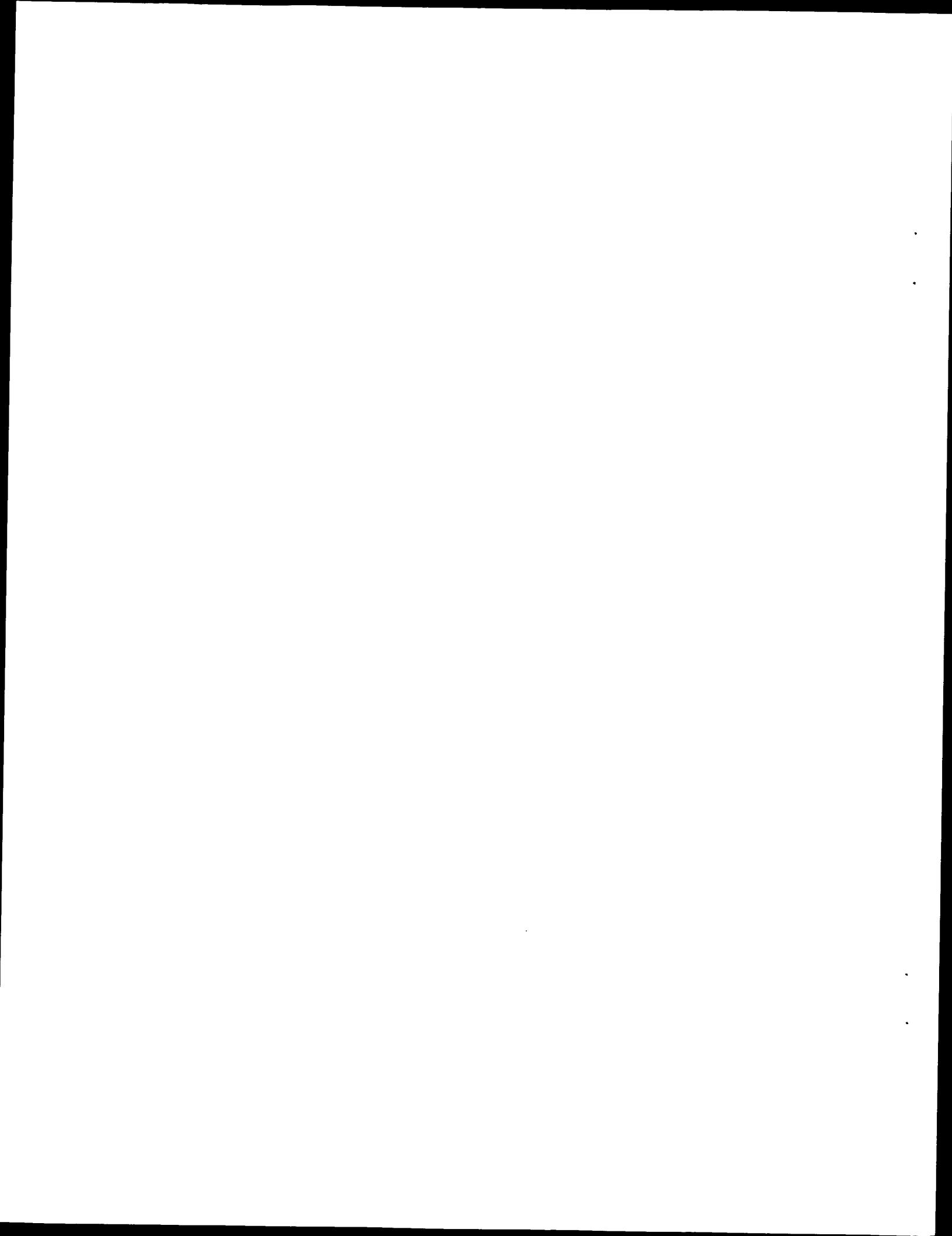
25 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2.1 for RACE



for mBSSP2 (forward)

<400> 23

tacagtgtccc agaaccatg

19

5

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSPF4 for RACE for mBSSP2 (forward)

<400> 24

15

ctcaactctc tgctagaccg

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2F5 to amplify mature mBSSP2-encoding region (forward)

25

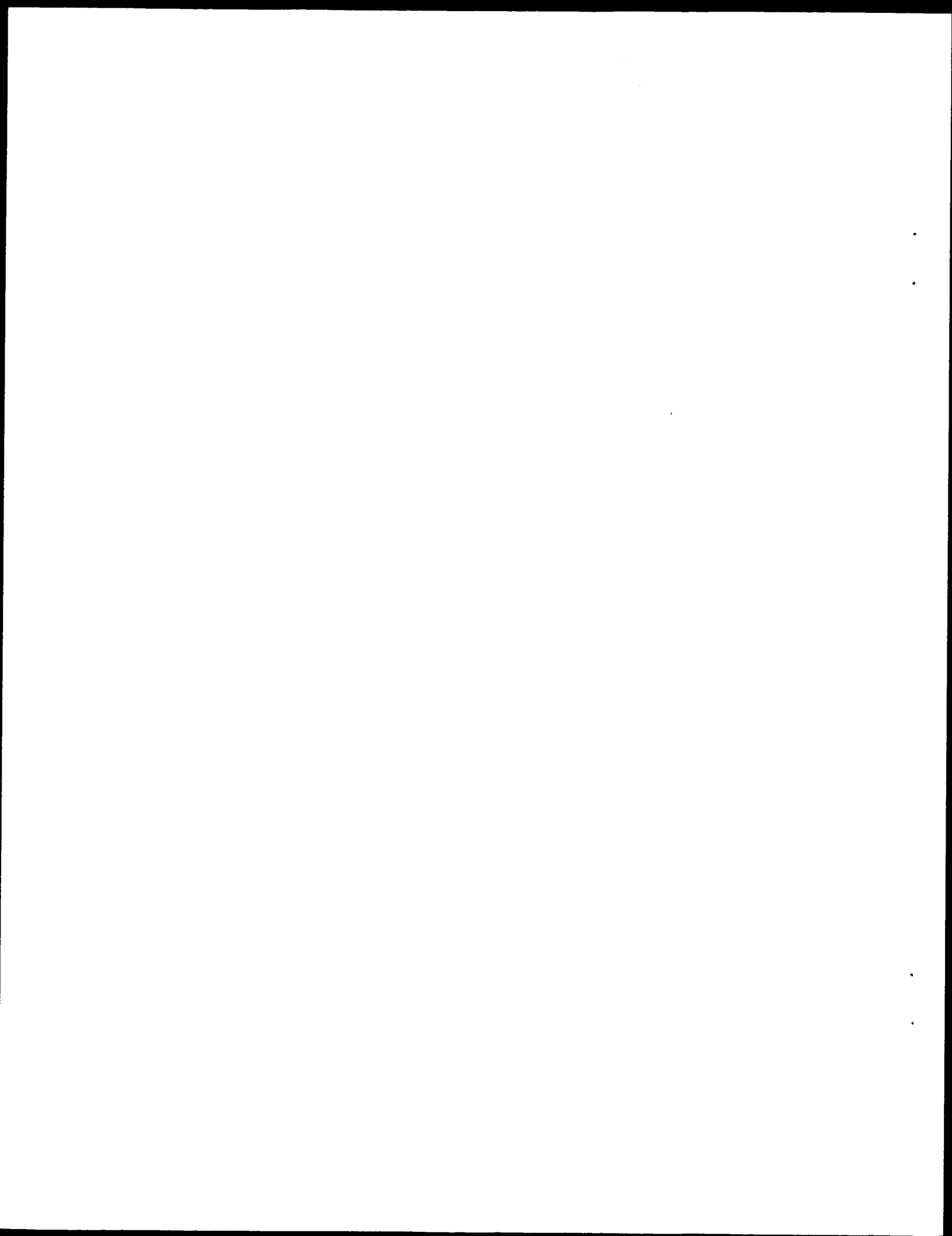
<400> 25

atagttggcg gccaaagctgt

20

<210> 26

<211> 20





<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5     <223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSPF7 to amplify  
full-length mBSSP2-encoding mRNA (forward)

<400> 26

cccagcagaa cttactgcct

20

10     <210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15     <223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2.2 for RACE  
for mBSSP2 (reverse)

<400> 27

tgttgcagag gtgggtgctg

20

20

<210> 28

<211> 21

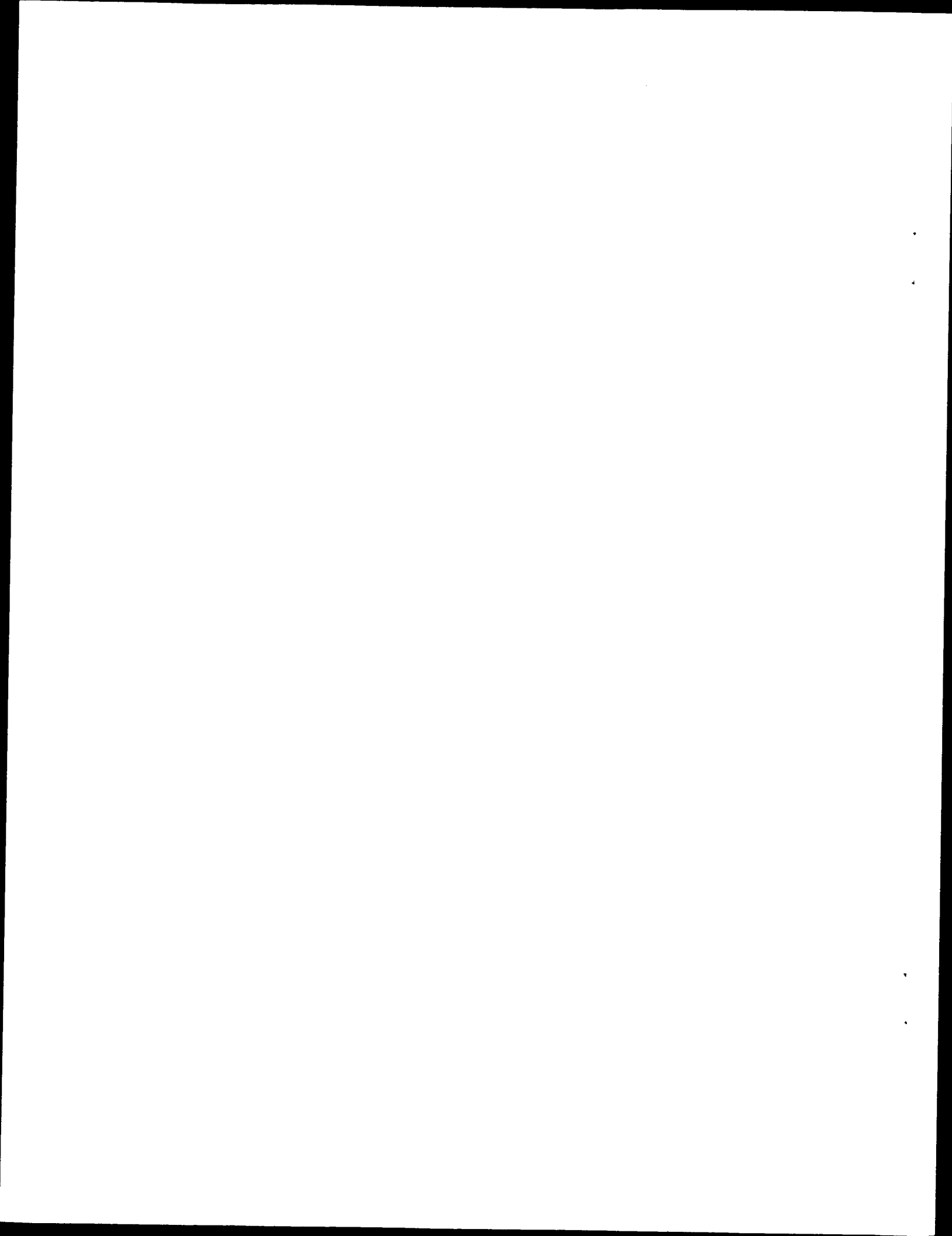
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25     <220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2R2 for RACE  
for mBSSP2 (reverse)

<400> 28



taccattgtg tcctgcagtg t

21

<210> 29

<211> 27

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP2R5/E to  
amplify full-length mBSSP2-encoding mRNA (reverse)

10

<400> 29

tgaattctgc tgcttcttcg gctagcg

27

<210> 30

15 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as BSSP2SPF to amplify  
a portion of hBSSP2 (forward)

20

<400> 30

actgctgccc actgcatg

18

25 <210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Designed oligonucleotide primer designated as BSSP2SPR to amplify a portion of hBSSP2 (reverse)

<400> 31

5 caggggtccc ccgctgtctc c 21

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2F11 for RACE for hBSSP2 (forward)

15 <400> 32

gctctcaact tctcagacac 20

<210> 33

<211> 20

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2R12 for RACE for hBSSP2 (reverse)

25

<400> 33

actcagctac cttggcgtag 20

<210> 34



<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2R11 for RACE  
for hBSSP2 (reverse)

<400> 34

cctggagcat atccgagctg

20

10

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15 <220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2F12 to amplify  
full length hBSSP2 (forward)

<400> 35

20 gctttacaac agtgctac

18

<210> 36

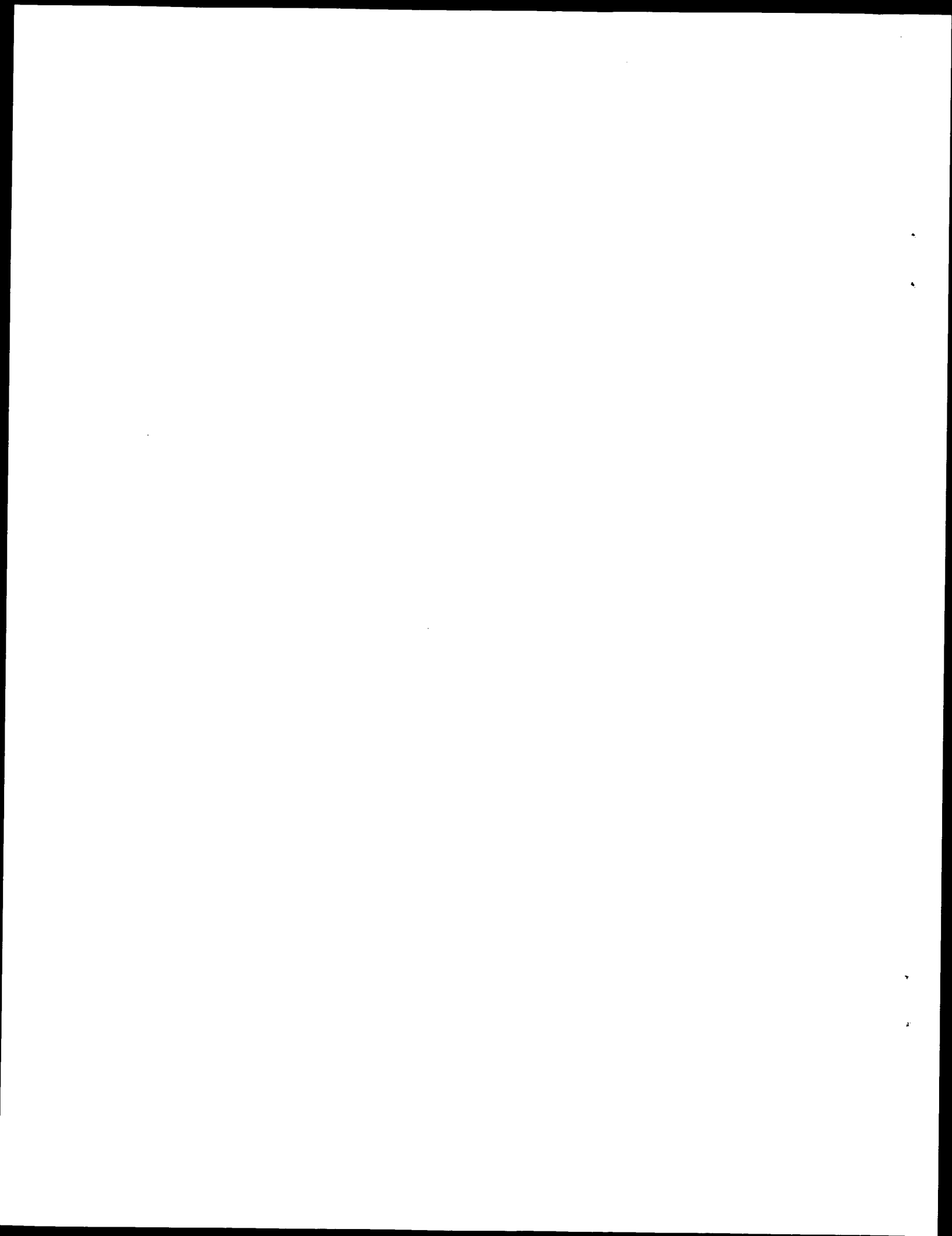
<211> 28

<212> DNA

25 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2R13/E to  
amplify full length hBSSP2 (reverse)





<400> 36

tggaattcga ggaaacagca ggactcag

28

<210> 37

5 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP2

10

<400> 37

tactagtcga cgcgtggcc

19

<210> 38

15 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP2F13 to amplify  
20 a portion of hBSSP2 (forward)

<400> 38

actgctgccc actgcatg

18

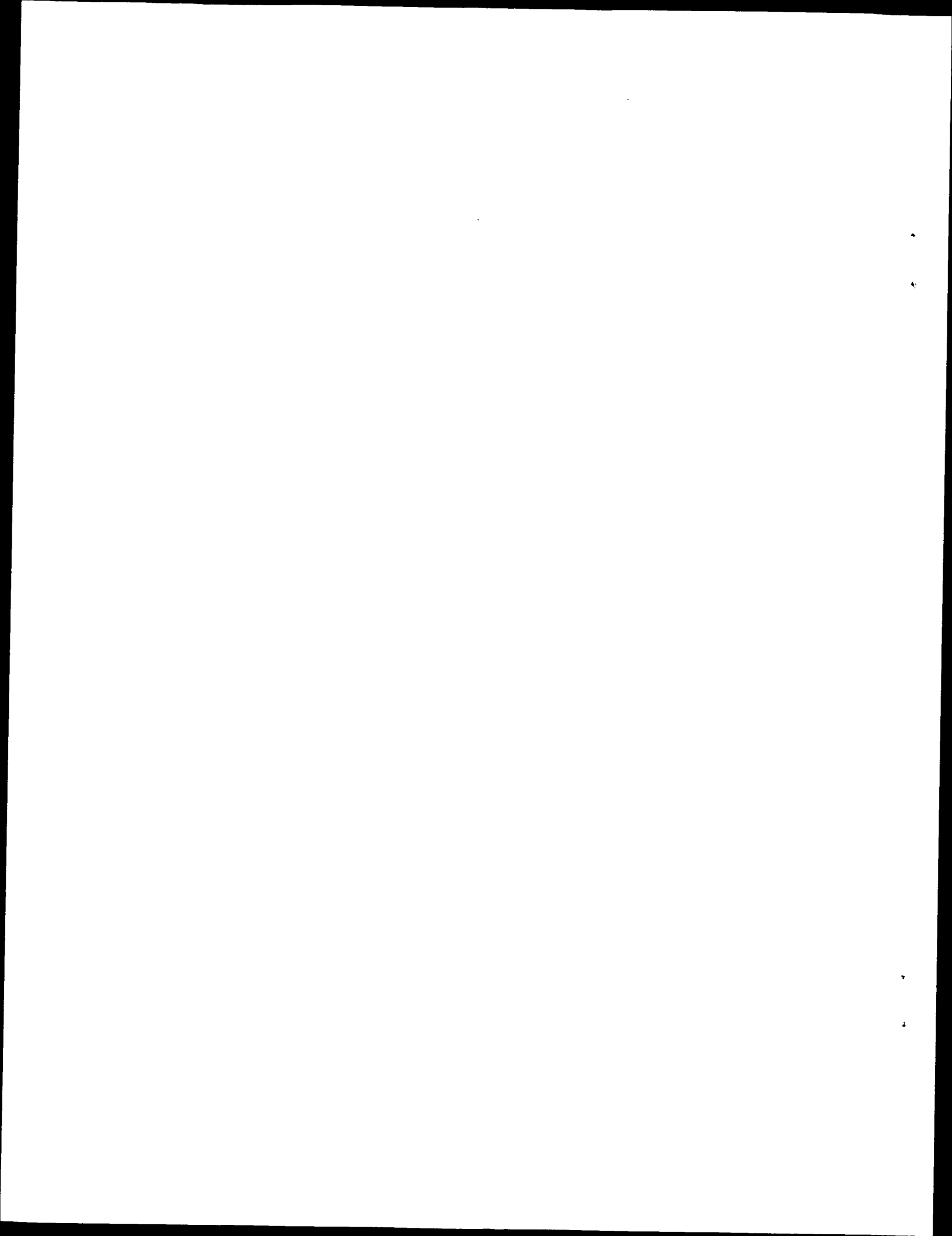
25 <210> 39

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Designed oligonucleotide primer designated as FBTrpsigtagF5 to detect hBSSP2

<400> 39

5 gcgctagcag atctccatga atctactcct gatcc 35

<210> 40

<211> 117

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 40

15 aagcttggct agcaacacca tgaatctact cctgatacctt acctttgttg ctgctgctgt 60  
tgctgcccc tttcaccatc accatcacca tgacgacgat gacaaggatc cgaattc 117

<210> 41

<211> 117

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

25 <400> 41

gaattcggat ccttgatcatc gtcgtcatgg tgatggatgat ggtgaaaggg ggcagcaaca 60  
gcagcagcaa caaaggtaga gatcaggagt agattcatgg tggtgctagc caagctt 117



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06475

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 9/64, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02,  
C12P21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027,  
G01N 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 9/64, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02,  
C12P21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027,  
G01N 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LITTLE, S.P. et al. "Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain", The Journal of Biological Chemistry (1997) Vol.272, No.40 p.25135-25142	1-40
Y	YAMAMURA, Y. et al. "Molecular cloning of a novel brain-specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications (1997) Vol.239, No.2 p.386-392	1-40
A	DANIEL, A. et al. "Excessive urokinase-type plasminogen activator activity in the euglobulin fraction of patients with Alzheimer-type dementia", Journal of the Neurological Sciences (1996) Vol.139, No.1 p.83-88	1-40
A	HINDS, T.R. et al., "Relationship between serum $\alpha$ 1-antichymotrypsin and Alzheimer's disease", Neurobiology of Aging (1994), Vol.15, No.1 p.21-27	1-40

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 February, 2000 (15.02.00)

Date of mailing of the international search report  
22 February, 2000 (22.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



4

2

7

1

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/06475

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 9/64, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02,  
C12P 21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027,  
G01N 33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/52, C12N 9/64, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/02,  
C12P 21/08, C12Q 1/68, C07K 16/40, A01K 67/027,  
G01N 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LITTLE, S.P. et al. "Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain", The Journal of Biological Chemistry (1997) Vol. 272, No. 40 p. 25135-25142	1-40
Y	YAMAMURA, Y. et al. "Molecular cloning of a novel brain -specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs", Biochemical and Biophysical Research Communications (1997) Vol. 239, No. 2 p. 386-392	1-40

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 02. 00

国際調査報告の発送日

22.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	DANIEL, A. et al. "Excessive urokinase-type plasminogen activator activity in the euglobulin fraction of patients with Alzheimer-type dementia", Journal of the Neurological Sciences (1996) Vol. 139 , No. 1 p. 83-88	1 - 4 0
A	HINDS, T.R. et al. "Relationship between serum $\alpha$ 1-antichymotrypsin and Alzheimer's disease", Neurobiology of Aging (1994) Vol. 15 , No. 1 p. 21-27	1 - 4 0